

加味四君子汤对脾虚犬小肠组织形态及 EGF 表达的影响*

何嫣婷, 夏晓冬, 舒迎霜, 贺濛初, 李 成,

冯士彬, 李 玉, 王希春, 吴金节**

(安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】探究加味四君子汤对脾虚犬小肠组织形态及 EGF 表达的影响。【方法】选择 1 岁龄的比格犬 24 只, 随机分为 4 组, 每组 6 只, 分别为对照组、脾虚组、自然恢复组、中药恢复组。对照组犬饲喂基础狗粮; 脾虚组、自然恢复组、中药恢复组犬每天以 6 mL/kg 番泻叶灌喂造模。第 7 天, 将脾虚组犬解剖采样, 中药恢复组在基础狗粮中添加 2% 加味四君子汤, 自然恢复组饲喂基础狗粮。第 14 天, 全部犬解剖采样。采集犬十二指肠、空肠中段、回肠进行 HE 染色, 测量肠绒毛长度、隐窝深度, 计算 V/C 值; 检测小肠 EGF 蛋白表达量以及 mRNA 相对表达量。【结果】与对照组相比, 脾虚组犬小肠出现弥漫性的肠道黏膜充血、水肿, 并有大量黏液渗出; 小肠绒毛稀疏、变短; 肠绒毛长度极显著降低 ($P<0.01$), 隐窝深度极显著升高 ($P<0.01$), 十二指肠、回肠 V/C 值显著降低 ($P<0.05$), 空肠 V/C 值极显著降低 ($P<0.01$); 小肠 EGF 的蛋白表达量极显著降低 ($P<0.01$), mRNA 表达量显著降低 ($P<0.05$)。用加味四君子汤治疗后, 中药恢复组各项指标均恢复到接近对照组水平。【结论】加味四君子汤能够使番泻叶诱导犬脾虚证的小肠组织形态、EGF 蛋白表达量以及 mRNA 相对表达量恢复正常, 对犬脾虚证有明显的治疗效果。

关键词: 犬; 脾虚; 加味四君子汤; 小肠组织形态; 表皮生长因子

中图分类号: S 853.74

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 03-0446-07

Effect of Supplementary Sijunzi Decoction on the Tissue Morphology and EGF Expression of Small Intestine in Splenic Asthenia Canines

HE Yanting, XIA Xiaodong, SHU Yingshuang, HE Mengchu, LI Cheng,

FENG Shibin, LI Yu, WANG Xichun, WU Jinjie

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: [Purpose] The present study was conducted to investigate the effects of supplementary Sijunzi decoction on the tissue morphology and EGF expression of small intestine in splenic asthenia canines. [Method] Twenty-four one-year-old beagles were selected and randomly divided into four groups (6 canines in each group). The four groups were control group, splenic asthenia group, natural recovery group and Chinese medicine recovery group, respectively. The canines in control group were fed a basal diet. The canines in splenic asthenia group, natural recovery group and Chinese medicine

收稿日期: 2018-05-04

修回日期: 2018-06-06

网络出版时间: 2019-03-09

*基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0501009)。

作者简介: 何嫣婷 (1993—), 女, 上海人, 在读硕士研究生, 主要从事兽医临床诊疗技术的研究。

E-mail: 417217415@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 吴金节 (1962—), 男, 安徽望江人, 硕士, 教授, 主要从事兽医临床诊疗技术和中兽药制剂的研究。E-mail: wjj@ahau.edu.cn

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201805011](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201805011)



recovery group were fed with Senna at 6 mL/kg a day. On the 7th day, the canines in splenic asthenia group were dissected for collecting samples, the canines in Chinese medicine recovery group were fed a basal diet with 2% supplementary Sijunzi decoction, and in natural recovery group were fed a basal diet. On the 14th day, all canines were dissected for collecting samples. Duodenum, jejunum and ileum of canines were collected to measure villus length, crypt depth and V/C values after HE staining and to detect EGF protein expression and EGF mRNA relative expression levels in small intestine. [Result] Compared with the canines in control group, the diffuse congestion and edema appeared in the small intestinal mucosa of canines in splenic asthenia group, and a large amount of mucous oozed out. The villi were sparser and shorter in small intestines, villus length extremely significantly decreased ($P<0.01$), crypt depth extremely significantly increased ($P<0.01$), V/C of duodenum and ileum significantly decreased ($P<0.05$) and V/C of jejunum extremely significantly decreased ($P<0.01$). EGF protein expression in small intestine significantly decreased ($P<0.05$) and EGF mRNA relative expression levels in small intestine extremely significantly decreased ($P<0.01$). After treating by supplementary Sijunzi decoction, the above indexes of the canines in Chinese medicine recovery group recovered close to the control group. [Conclusion] Supplementary Sijunzi decoction can improve the tissue morphology, EGF protein expression and EGF mRNA relative expression levels in small intestine, and has obvious effects on treating the canines with splenic asthenia syndrome.

Keywords: canines; splenic asthenia; supplementary Sijunzi decoction; small intestine tissue morphology; epidermal growth factor

脾虚证是一种全身性的病理状态, 影响多个脏器, 是临床上较为常见的消化道疾病。中医藏象学说是以五脏为中心的系统学说, 其中脾的概念不只包括解剖学上脾或者胰腺, 更是涵盖了以胃、十二指肠、空肠和回肠等消化系统在内的一个综合系统^[1]。“脾主运化”的功能提示了脾系统与小肠的消化和吸收功能密不可分^[2]。临床上, 相当一部分免疫及消化功能尚不完善的幼犬、病后初愈犬和年老体衰犬患有脾虚泄泻证。

四君子汤出自宋代医学著作《太平惠民和剂局方》, 由人参、白术、茯苓和炙甘草 4 味中药组成。作为经典的补脾益气方剂, 四君子汤具有抗衰老、抗肿瘤和促进代谢等作用^[3]。现代药理学研究多着重于其增强机体免疫、调节胃肠活动、胃肠激素、修复胃肠黏膜损伤和促进消化吸收等方面^[4]。本试验中加味四君子汤由四君子汤、神曲、山楂、黄芪等中药按一定比例组成。神曲主要成分为挥发油、维生素 B 和脂肪油等酵母制剂, 此外还含有大量 Zn、Fe 和 Cu 等微量元素, 能利用氧化供能, 促进机体消化吸收, 利用食物中蛋白质, 引起增进食欲、促进消化等多重功效^[5]。山楂具有消食健胃、行气散瘀和化浊降

脂之功效, 在心脑血管系统、消化系统及糖代谢等方面均具有较强的药理作用^[6]。黄芪具有补气升阳、生津养血、行滞通痹、托毒排脓和敛疮生肌的功效^[7]。本课题组前期的研究表明: 加味四君子汤方剂能提高脾虚犬消化吸收功能, 增强免疫力, 改善脾虚犬全身机能状态^[8]。本试验进一步研究该加味四君子汤对脾虚犬小肠形态学结构以及小肠表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 表达的影响, 探讨加味四君子汤对脾虚犬消化吸收功能的作用及其机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用比格犬由南京亚东实验动物研究开发中心提供。

番泻叶、党参、白术、茯苓、炙甘草、神曲、山楂和黄芪等中药材购自合肥立方大药房。苏木素、伊红购自南京建成生物有限公司。TRI-ZOL 购自 Invitrogen 公司。无水乙醇、异丙醇购自无锡展望化工他有限公司。DEPC 水购自 MDL 公司。UltraPure Agarose、SuperScript III RT 反转录 kit 和 Sybr qpcr mix 购自 ABI-invitrigen 公司。

96 孔板、ep 管和枪头购自 abi 公司。

XN-TN50 中药提取设备购自合肥小牛轻工械有限公司，核酸浓度测定仪购自 THERMO 公司，qPCR 仪购自 Applied biosystems (USA) 公司，微量移液器购自 Eppendaorf，TGL-18R 台式高速离心机购自珠海黑马医学仪器有限公司，超净工作台购自苏州智净净化设备有限公司，电泳仪、凝胶成像仪购自 biorad 公司。

1.2 中药制备

1.2.1 番泻叶

根据文献[9]，取番泻叶 20 kg，加 10 倍量沸水浸泡 10 min 过滤，将滤液在 75 ℃ 水浴中蒸发浓缩为 1 g/mL 的药液，4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 加味四君子汤

根据文献[10]，将党参、白术、茯苓、甘草、黄芪和山楂等中药按一定比例先用水浸泡 2 h，再一起在水中煎沸 2 次，每次 40 min，合并滤液，80 ℃ 常压浓缩为 1 g/mL 的药液，4 ℃ 保存备用。

1.3 试验动物分组与模型建立

选取 24 只 1 岁龄比格犬，体重 10.5~11 kg，正常饲养观察 7 d，进行常规免疫与驱虫，确定为健康犬后用于试验。

将 24 只犬随机分为 4 组，即对照组、脾虚组、自然恢复组、中药恢复组，每组 6 只。对照组饲喂基础饲料。脾虚组、自然恢复组和中药恢复组以 6 mL/kg 的番泻叶灌喂，上、下午各 1 次，饲料照常。当造模犬表现出大便溏泄、食少纳滞、消瘦、体重减轻、神态萎靡、毛色无光泽等症状，符合“中医脾虚证参考标准”和“造模脾虚型标准”，即判定试验犬出现中医脾虚证候。将脾虚组犬颈动脉放血致死进行剖检，余下对照组、自然恢复组饲喂基础饲料，中药恢复组在饲料中添加 2% 加味四君子汤。14 d 后，全部犬放血致死进行剖检。

1.4 样品采集

将试验犬放血处死后，采用外科手术的方法打开腹腔，迅速取出十二指肠、空肠、回肠和直肠各约 2 cm。各段采样位置：十二指肠，距幽门 2~5 cm 处采集；空肠，整个空肠中段处采集；回肠，距回盲口处 3~5 cm 处采集；直肠，大肠末端长约 15~16 cm 处，位于小骨盆内。十二指肠、空肠、回肠组织采集后，取各肠段 1 cm

生理盐水冲洗干净，分别放入 10% 中性甲醛和 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，连续横断切片，厚 5 μm，进行常规 HE 染色和免疫组化。同时选取部分十二指肠、空肠、回肠组织，修整组织块的大小并迅速放入冻存管中，置于液氮中速冻，-80 ℃ 冷冻保存，用于测定小肠组织 EGF 的 mRNA 相对表达量。

1.5 测定指标及方法

1.5.1 小肠组织形态学观察

常规 HE 染色，中性胶封片。光镜下详细观察和比较各组肠绒毛和隐窝形态结构变化情况，并利用 Proplus 照相处理软件测量肠绒毛长度和隐窝深度，每个肠管取 2 张切片，每张切片选取 3 个最长绒毛长度最深隐窝深度进行测量。

1.5.2 小肠各段 EGF 蛋白表达的检测

采用常规免疫组化的方法检测小肠组织 EGF 表达量，同时设置阴性对照，以 PBS 替代一抗、二抗，试验结束后用光镜对免疫组化肠道进行拍照，同一组织选择 3 个视野，应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对图片进行分析统计，结果以平均光密度值表示。

1.5.3 小肠各段 EGF 的 mRNA 相对表达量检测

利用 Trizol 法提取试验犬各段小肠组织的总 RNA。将提取到的总 RNA 采用 SuperScript III RT 反转录 kit 试剂盒合成 cDNA。依据 GeneBank 中 EGF 及内参 actin 的序列 (登录号分别为 NM_001195845.2 和 XM_014109884.2)，利用 Premier 5.0 软件设计引物，引物由上海生工生物工程股份有限公司合成 (表 1)。使用 Sybr qpcr mix 试剂，采用 ABI-7900 实时荧光定量 PCR 检测小肠中 EGF mRNA 相对表达量，结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

表 1 用于 PCR 扩增的引物序列
Tab. 1 Primer sequence for PCR amplification

引物 primer	引物序列 (5'→3') primer sequence	扩增片段长度/bp amplification size
actin-F	TGTGTTATGTGGCCCTGGAC	164
actin-R	TTCCATGCCCAGGAAGGAAG	
EGF-F	TATTGCAACAAAGGGCCCCA	182
EGF-R	AGGACCCTGGGTTGGTGATT	

1.6 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)，以 Duncan 氏法进行多重比较，结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 犬小肠黏膜的变化

对照组小肠各段肠黏膜上皮完整、连续, 腺体排列规则。脾虚组小肠各段出现弥漫性的肠道黏膜充血、水肿, 并有大量黏液渗出。自然恢复组小肠各段部分肠黏膜充血并伴有轻微水肿。中药恢复组肠黏膜正常, 无可见病变。

2.2 加味四君子汤对脾虚犬小肠组织形态的影响

由 HE 染色结果 (图 1) 可见: 对照组肠绒毛密度高, 粗细均匀且排列整齐。脾虚组绒毛稀疏, 变短且部分裸露固有层。自然恢复组绒毛密度低, 绒毛变短。中药恢复组绒毛密度部分缺损, 整体尚可, 排列整齐。

2.3 加味四君子汤对脾虚犬小肠绒毛长度的影响

由图 2 可知: 十二指肠中, 脾虚组、自然恢复组均极显著低于对照组 ($P<0.01$), 中药恢复组与对照组无显著差异 ($P>0.05$); 自然恢复组显著高于脾虚组 ($P<0.05$), 中药恢复组极显著高于脾虚组 ($P<0.01$); 中药恢复组极显著高于自然恢复组 ($P<0.01$)。空肠与回肠中, 脾虚组、自然恢复

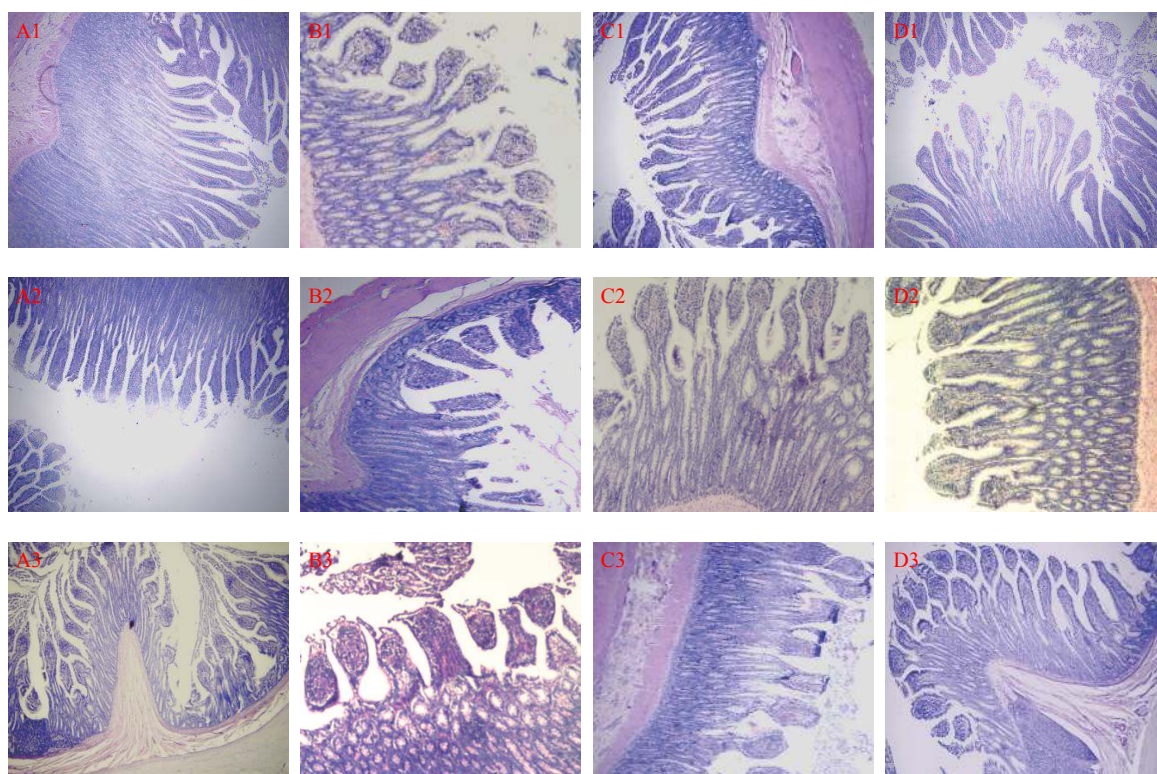
组均极显著低于对照组 ($P<0.01$), 中药恢复组与对照组无显著差异 ($P>0.05$); 自然恢复组显著高于脾虚组 ($P<0.05$), 中药恢复组极显著高于脾虚组 ($P<0.01$); 中药恢复组显著高于自然恢复组 ($P<0.05$)。

2.4 加味四君子汤对脾虚犬小肠隐窝深度的影响

由图 2 可知: 十二指肠、回肠中, 脾虚组、自然恢复组均极显著高于对照组 ($P<0.01$), 中药恢复组与对照组无显著差异 ($P>0.05$); 自然恢复组、中药恢复组均极显著低于脾虚组 ($P<0.01$); 中药恢复组显著低于自然恢复组 ($P<0.05$)。空肠中, 脾虚组极显著高于对照组 ($P<0.01$), 自然恢复组显著高于对照组 ($P<0.05$), 中药恢复组与对照组无显著差异 ($P>0.05$); 自然恢复组、中药恢复组均极显著低于脾虚组 ($P<0.01$); 自然恢复组、中药恢复组相比无显著差异 ($P>0.05$)。

2.5 加味四君子汤对脾虚犬小肠 V/C 值的影响

由图 2 可知: 十二指肠中, 脾虚组、自然恢复组均极显著低于对照组 ($P<0.01$), 中药恢复组显著低于对照组 ($P<0.05$); 自然恢复组显著高于脾虚组 ($P<0.05$), 中药恢复组极显著高于脾虚组

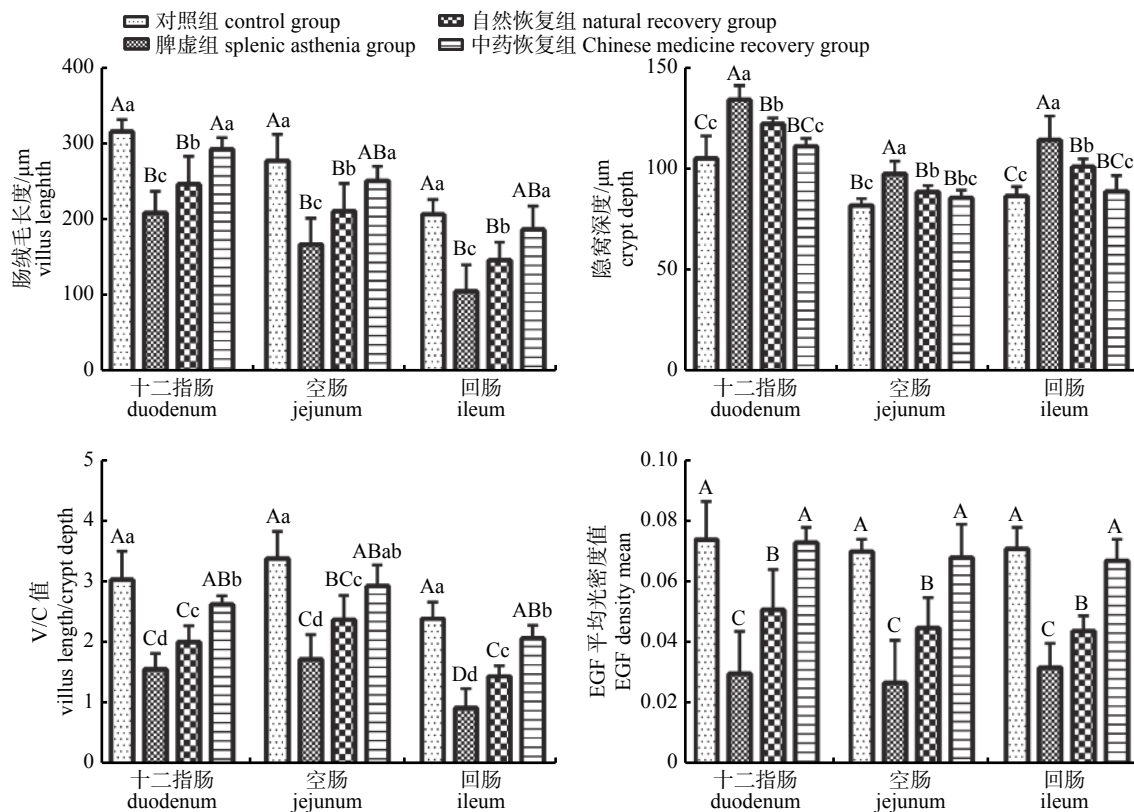


注: A. 对照组; B. 脾虚组; C. 自然恢复组; D. 中药恢复组; 1. 十二指肠; 2. 空肠; 3. 回肠。

Note: A. control group; B. splenic asthenia group; C. natural recovery group; D. Chinese medicine recovery group; 1. duodenum; 2. jejunum; 3. ileum.

图 1 犬小肠组织 (HE 染色, $\times 400$)

Fig. 1 The small intestine tissues of canine (HE staining, $\times 400$)



注：同一组织不同处理组相比，图柱上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Among different groups in the same tissue, different small letters indicate significant difference at $P < 0.05$ levels, while different capital letters indicate significant difference at $P < 0.01$ levels.

图 2 加味四君子汤对脾虚犬小肠绒毛长度、隐窝深度、V/C 值和 EGF 水平的影响

Fig. 2 Effects of supplementary Sijunzi decoction on the villus length, crypt depth, V/C and EGP protein expression in small intestine of canines with splenic asthenia

($P < 0.01$)；中药恢复组极显著高于自然恢复组 ($P < 0.01$)。空肠中，脾虚组、自然恢复组均极显著低于对照组 ($P < 0.01$)，中药恢复组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)；自然恢复组显著高于脾虚组 ($P < 0.05$)，中药恢复组极显著高于脾虚组 ($P < 0.01$)；中药恢复组显著高于自然恢复组 ($P < 0.05$)。回肠中，脾虚组、自然恢复组均极显著低于对照组 ($P < 0.01$)，中药恢复组显著低于对照组 ($P < 0.05$)；自然恢复组、中药恢复组均极显著高于脾虚组 ($P < 0.01$)；中药恢复组极显著高于自然恢复组 ($P < 0.01$)。

2.6 加味四君子汤对脾虚犬小肠 EGF 表达的影响

IHC 检测结果 (图 3) 显示：棕黄色区域为阳性表达产物，经苏木素复染，细胞核呈蓝色，细胞质为浅蓝色，细胞膜不着色。试验犬各肠段均有 EGF 蛋白表达，阳性产物主要分布在肠绒毛两侧以及肠腺周围。

由图 2 可知：各肠段中，脾虚组、自然恢复组 EGF 表达水平均极显著低于对照组 ($P < 0.01$)，中

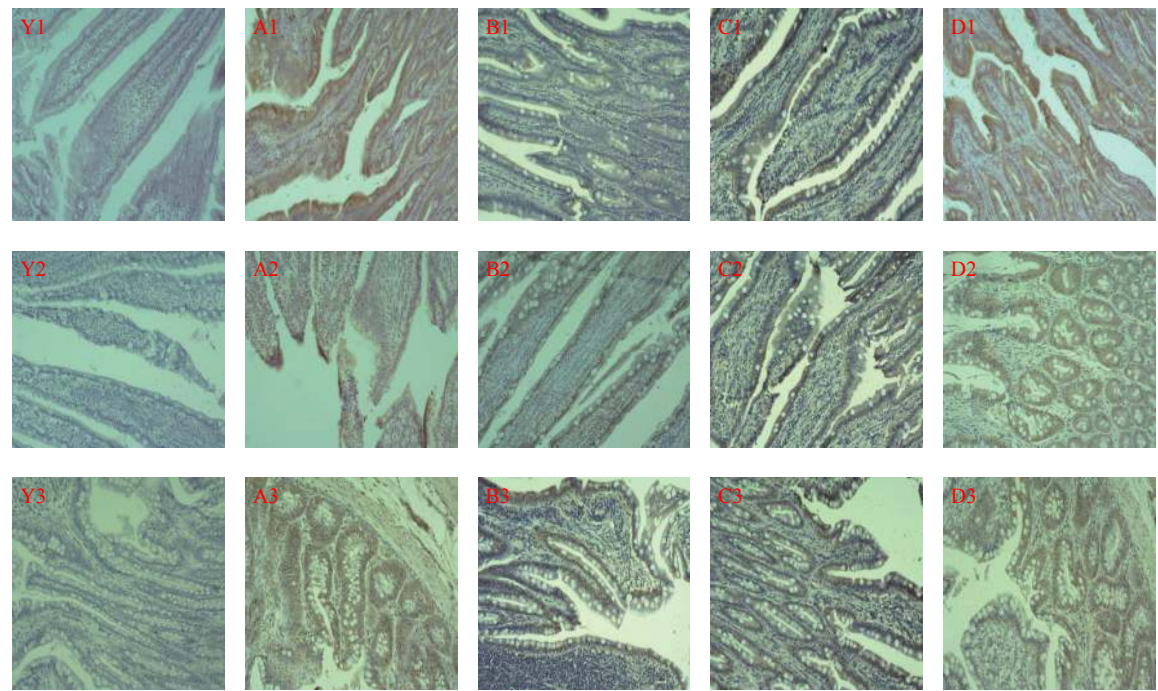
药恢复组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。自然恢复组、中药恢复组均极显著高于脾虚组 ($P < 0.01$)。中药恢复组极显著高于自然恢复组 ($P < 0.01$)。

2.7 加味四君子汤对脾虚犬小肠 EGF 的 mRNA 表达量的影响

由表 2 可知：十二指肠中，脾虚组、自然恢复组均显著低于对照组 ($P < 0.05$)，中药恢复组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)；自然恢复组与脾虚组无显著差异 ($P > 0.05$)，中药恢复组显著高于脾虚组 ($P < 0.05$)；自然恢复组与中药恢复组无显著差异 ($P > 0.05$)。空肠、回肠中，脾虚组、自然恢复组均显著低于对照组 ($P < 0.05$)，中药恢复组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)；自然恢复组与中药恢复组、脾虚组均无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

脾主运化水谷精微，即完成对饮食物的消化和吸收。《黄帝内经·灵兰秘典论》有云：“小肠



注: Y. 阴性对照; A. 对照组; B. 脾虚组; C. 自然恢复组; D. 中药恢复组; 1. 十二指肠; 2. 空肠; 3. 回肠。
Note: Y. negative control; A. control group; B. splenic asthenia group; C. natural recovery group; D. Chinese medicine recovery group; 1. duodenum; 2. jejunum; 3. ileum.

图 3 犬小肠免疫组化图片 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Immunohistochemical photograph of EGF in small intestine of canines (IHC, ×400)

表 2 脾虚犬小肠 EGF 的 mRNA 相对表达量

Tab. 2 Relative expression levels of EGF mRNA in small intestine of canines with splenic asthenia				
肠段 section	对照组 control group	脾虚组 splenic asthenia group	自然恢复组 natural recovery group	中药恢复组 Chinese medicine recovery group
十二指肠 duodenum	3.563±2.696 a	1.18±0.835 c	1.373±0.707 bc	3.402±2.008 ab
空肠 jejunum	2.719±2.047 a	0.757±0.606 b	1.039±1.000 b	1.961±1.419 ab
回肠 ileum	3.607±2.874 a	0.923±0.644 b	1.426±1.461 b	2.665±0.616 ab

注: 同行不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different small letters in the same rows indicate significant difference at ($P<0.05$) levels.

者, 受盛之官, 化物出焉。”可见在中医以消化吸收为主功能的脾系统中, 小肠的功能是包含其中的^[11]。小肠是营养物质消化和吸收的主要场所, 脾虚组犬小肠各段出现弥漫性的肠道黏膜充血、水肿, 并有大量黏液渗出。小肠表面积的大小则直接反映小肠吸收功能, 绒毛和隐窝的形态特征是反映上皮细胞的成熟度及吸收功能的最常用指标, 绒毛越长, 隐窝越浅, 表明肠道消化吸收营养物质的能力越强^[12]。V/C 值则是小肠功能状态的一种反映, 比值与黏膜状态成正比^[13]。故在本试验中以肠绒毛长度、隐窝深度和 V/C 值来衡量加味四君子汤对脾虚犬小肠黏膜的影响。结果发现: 番泻叶诱导脾虚犬与对照组相比小肠绒毛长度极显著下降, 隐窝深度极显著升高且极 V/C

值显著降低。但经过加味四君子汤治疗后, 试验犬上述各项指标基本恢复到对照组水平。研究表明: 四君子汤内含有多种抗氧化成分, 能消除细胞组织的各类氧化损伤, 维持生物膜正常结构和功能^[14]。YU 等^[15]通过研究家兔肠梗阻模型发现: 四君子汤治疗能降低肠道黏膜 CD3⁺、CD8⁺T 细胞百分率, 升高 CD4⁺T 细胞数量, 从而调节适应性免疫反应。且四君子汤中的甘草黄酮提取物可促进小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 迁移, 影响细胞内多胺调控信号通路, 有助于胃肠黏膜损伤的修复^[16]。本研究通过对服用加味四君子汤治疗后的脾虚犬肠绒毛、隐窝及 V/C 值测量分析, 结果表明加味四君子汤具有保护和修复小肠形态结构的作用, 从而改善脾虚犬部分病理症状。

犬表皮生长因子 EGF 主要由颌下腺合成分泌^[17-18], 肾脏、胰脏、肝脏、乳腺和十二指肠 Brunner 腺等组织器官中也能合成并分泌, 具有促细胞生长、细胞迁移、细胞增殖、伤口愈合及营养物质转运等生物学功能^[19-21]。研究表明: EGF 的信号传导可调节肠道上皮细胞的增殖和生存^[22]、肠黏膜形态结构、刷状缘组织中消化酶活性变化^[23], 还可调节肠道消化腺的分泌, 刺激黏膜增生, 影响营养物质的吸收与转运, 在维持动物肠道健康中发挥重要的生物学功能^[24]。EGF 阳性细胞多呈圆形或椭圆形, 阳性蛋白在肠绒毛两侧及肠腺周围分布。本试验在脾虚证犬饲料中添加加味四君子汤后, 通过免疫组化研究发现: 相比脾虚犬, 中药治疗组犬肠绒毛顶部及肠腺周围分布的 EGF 蛋白含量显著增加, 而自然恢复组增加不明显; 通过荧光定量 PCR 检测结果也证实, 在转录水平上中药恢复组 EGF 的 mRNA 的含量明显增加。两种检测结果基本一致, 说明加味四君子汤能提高犬体内 EGF 的表达水平, 从而保护肠上皮细胞, 促进黏膜修复。

4 结论

番泻叶可诱导犬小肠组织形态结构发生病变, EGF 蛋白表达量以及 mRNA 含量显著下降。加味四君子汤能够使番泻叶诱导犬脾虚证的小肠组织形态学、EGF 蛋白表达量以及 mRNA 相对表达量恢复正常, 对犬脾虚证有明显的治疗效果。

[参考文献]

- [1] 刘大鹏. 脾虚在功能性胃肠病中辨证意义及相关规律的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [2] 吕林, 唐旭东, 王凤云, 等. 从“脾主运化”理论探讨论治功能性胃肠病[J]. 时珍国医国药, 2016(1): 160.
- [3] 纪云飞, 王瑞君, 李晓波. 复方四君子汤的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(5): 837.
- [4] 吕苑. 四君子汤的药理研究和临床应用[J]. 中医研究, 2012, 25(1): 76. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6910.2012.01.037.
- [5] 刘双, 杨静, 江振作, 等. 中药“神曲”发酵工艺及质量标准研究进展[J]. 天津中医药, 2015, 32(5): 318.
- [6] JURIKOVA T, SOCHOR J, ROP O, et al. Polyphenolic profile and biological activity of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) fruits[J]. Molecules, 2012, 17(12): 14490. DOI: 10.3390/molecules171214490.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [8] 刘静. 犬脾虚模型的建立及中药制剂的治疗效果[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- [9] 肖新云, 邓艳玲, 刘又嘉, 等. 番泻叶所致脾虚泄泻小鼠血常规的研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(6): 49. DOI: 10.3969/j.issn.1008-987x.2016.06.15.
- [10] 石达友, 李盛强, 朱华君, 等. 四君子汤对脾虚犬体重及部分血清生化指标的影响[J]. 动物医学进展, 2010, 31(9): 29. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2010.09.007.
- [11] 王月婷. 不同频率摩腹对脾虚家兔胃肠黏膜形态影响的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [12] RIEGER J, JANCZYK P, HÜNIGEN H, et al. Intraepithelial lymphocyte numbers and histomorphological parameters in the porcine gut after *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 feeding in a *Salmonella* Typhimurium challenge[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2015, 164(1/2): 40. DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.12.013.
- [13] 陈功义, 郝振芳, 肖传斌. 大豆异黄酮对固始鸡小肠形态结构的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(11): 3426. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267x.2014.11.032.
- [14] YE L, GONG J W, WANG Y H, et al. Pharmacological activities of Sijunzi decoction which are related to its antioxidant properties[J]. Journal of Chemistry, 2014(33): 1. DOI: 10.1155/2014/278318.
- [15] YU X Y, CUI Z G, ZHOU Z L, et al. Si-Jun-Zi decoction treatment promotes the restoration of intestinal function after obstruction by regulating intestinal homeostasis[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014(11): 928579. DOI: 10.1155/2014/928579.
- [16] 李茹柳, 陶玉珠, 温鹏, 等. 甘草黄酮提取物对小肠上皮细胞 IEC-6 迁移及多胺的影响[J]. 中草药, 2013, 44(19): 2722. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.017.
- [17] BARNARD J A, BEAUCHAMP R D, RUSSELL W E, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology[J]. Gastroenterology, 1995, 108(2): 564. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90087-X.
- [18] PLAYFORD R J, WRIGHT N A. Why is epidermal growth factor present in the gut lumen?[J]. Gut, 1996, 38(3): 303. DOI: 10.1136/gut.38.3.303.
- [19] 汤小朋, 刘虎, 杨淑芬, 等. 表皮生长因子在动物肠道无机离子及其他营养物质吸收中的作用[J]. 动物营养学报, 2016, 28(8): 2317. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267x.2016.08.001.
- [20] 汤小朋, 方热军. 表皮生长因子对早期断奶仔猪生长性能及肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(11): 3345. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267x.2015.11.005.
- [21] TANG X P, LIU H, YANG S F, et al. Epidermal growth factor and intestinal barrier function[J]. Mediators of Inflammation, 2016: 1927348. DOI: 10.1155/2016/1927348.
- [22] ABUD H, WATSON N J. Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling[J]. Experimental Cell Research, 2005, 303(2): 252. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.10.006.
- [23] 范志勇, 王康宁, 周定刚. 不同水平表皮生长因子对早期断奶仔猪生产性能、血清理化指标及免疫功能的影响[J]. 动物营养学报, 2005, 17(3): 41.
- [24] 任丹丹, 贺胜男, 曹程鸣, 等. 加味四君子汤对仔猪消化吸收功能及小肠 EGF 表达的影响[J]. 中国兽医科学, 2016(8): 1065.

责任编辑: 何承刚