

◆古籍古方研究◆

芍药汤对湿热蕴结型溃疡性结肠炎大鼠
肠黏膜通透性相关蛋白表达的影响

祖健, 孙晨安, 赵党生, 王凤仪, 蒲晓薇

甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 探究芍药汤对湿热蕴结型溃疡性结肠炎 (Ulcerative colitis, UC) 大鼠肠黏膜通透性的作用机理。方法: 将 60 只大鼠随机分为空白组、模型组、芍药汤高、中、低剂量组、柳氮磺吡啶 (Salicylazosulfa Pyridin, SASP) 组 (西药组), 每组 10 只, 雌雄各半, 采用高脂高糖辛辣饮食+免疫复合法+2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (Trinitrobenzenesulfonic Acid, TNBS) 结合乙醇的方法复制湿热蕴结型 UC 大鼠模型, 用药干预后第 21 天处死, 取大鼠结肠病变部位组织, 检测结肠组织中 ZO-1、Occludin mRNA 及蛋白表达。结果: 与空白组比较, 模型组中 ZO-1、Occludin mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组中 ZO-1 和 Occludin mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$), 芍药汤高、中剂量组 ZO-1 及 Occludin mRNA 表达显著提高 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组中 ZO-1、Occludin 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组、芍药汤各剂量组中 ZO-1、Occludin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。结论: 芍药汤可以改善湿热蕴结型 UC 大鼠的肠黏膜通透性, 修复肠黏膜屏障功能, 达到治疗 UC 的目的。

[关键词] 溃疡性结肠炎 (UC); 芍药汤; 湿热蕴结型; ZO-1; Occludin; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R574.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 03-0064-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.03.020

Shaoyao Tang Has Effect on Related Protein Expressions of Intestinal Permeability of Rats with Ulcerative Colitis of Retention of Damp-heat Type

ZU Jian, SUN Chen'an, ZHAO Dangsheng, WANG Fengyi, PU Xiaowei

Abstract: **Objective:** To explore the mechanism of Shaoyao tang on the intestinal permeability of rats with ulcerative colitis (UC) of retention of damp-heat type. **Methods:** Divided 60 rats randomly into the blank group, the model group, the Shaoyao tang groups of high-dose, medium-dose and low-dose, the salicylazosulfa pyridin (SASP) group (the western medicine group), 10 rats in each group with average male and female. Adopted the methods of high-glucose-high-fat and spicy diet, immunity complex method and 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), combined with alcohol to copy rats model with UC of retention of damp-heat type. After 21-day of drug intervention, the rats were sacrificed and took the tissues of lesion sites in the colons to detect the expressions of ZO-1, Occludin mRNA and protein in the colon tissues. **Results:** Compared with the blank group, the expressions of ZO-1 and Occludin mRNA in the model group were obviously decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expressions of ZO-1 and Occludin mRNA in the western medicine group were obviously increased ($P < 0.01$), and the expressions of ZO-1 and Occludin mRNA in the Shaoyao tang groups of high-dose and medium-dose were obviously increased ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the expression levels of ZO-1 and Occludin in the model group were obviously decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of ZO-1 and Occludin in the western medicine group and the Shaoyao tang group of each doses were obviously increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shaoyao tang can improve intestinal permeability of rats with UC of retention of damp-heat

[收稿日期] 2018-07-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81560746); 甘肃中医药大学研究生创新项目 (CX2018-03)

[作者简介] 祖健 (1992-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗肛肠疾病。

[通信作者] 赵党生, E-mail: zhds69@126.com。

type and repair the intestinal mucosal barrier function to treat UC.

Keywords: Ulcerative colitis(UC); Shaoyao tang; Retention of damp-heat type; ZO-1; Occludin; Animal experiment; Rats

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种由多种因素导致的非特异性大肠黏膜慢性炎症和溃疡性疾病,其发病原因尚存在争论^[1]。其临床表现为腹部疼痛、腹泻、大便中有黏液脓血,病理上主要表现为溃疡、瘢痕、炎症细胞浸润。其发病通常由肠黏膜屏障功能内环境平衡被打破、肠黏膜通透性改变引起^[2]。紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 是维持肠黏膜通透性的重要蛋白分子,其表达上调可使细胞间紧密连接发生改变,从而打破细胞间结构的完整性,使其功能失调导致疾病的发生^[3-4]。本研究通过采用高脂高糖辛辣饮食加免疫复合法+2,4,6-三硝基苯磺酸(Trinitrobenzenesulfonic Acid, TNBS)结合乙醇的方法复制湿热蕴结型 UC 大鼠,观察芍药汤对 UC 模型大鼠结肠组织中 ZO-1/Occludin mRNA 及蛋白表达的影响。进一步探讨其治疗机理,为临床应用芍药汤治疗 UC 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,平均体重(210±10)g,动物许可证号 SCXK(甘)2015-0001,均由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂 芍药汤由芍药 15 g,大黄、黄芩各 10 g,黄连、槟榔、炙甘草各 6 g,当归 12 g,肉桂、木香各 9 g 组成,以上药材由甘肃中医药大学附属医院中药房提供。TNBS 由 Sigma 公司提供;柳氮磺吡啶肠溶片(SASP)为上海信谊嘉华制药有限公司产品;十二烷基硫酸钠(SDS)为 Sigma 公司产品;Protein G Magnetic Beads 为 Cell Signaling 公司产品;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、Goat Anti-Rabbit IgG,均为 Bioswamp 产品;兔抗 ZO-1 抗体、兔抗 Occludin 抗体,均为 Abcam 产品;YBR Green PCR 试剂盒为 KAPA Biosystems 产品;逆转录试剂盒为 TAKARA 公司产品;PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;北京红星二锅头为北京红星股份有限公司产品;食用猪油为江苏南顺食品有限公司产品。

1.3 实验仪器 电泳仪、荧光定量 PCR 仪、凝胶成像系统、水平电泳设备均为 BIO-RAD 公司产品,全自动化学发光分析仪为上海天能公司产品,酶标仪为芬兰雷勃公司产品。

1.4 动物模型制备及给药方法 60 只健康 Wistar 大鼠按照随机数字表法分成空白组、模型组、芍药汤高剂量组(高剂量组)、芍药汤中剂量组(中剂量组)、芍药汤低剂量组(低剂量组)、SASP 组(西药组),每组 10 只,雌雄各半,各组大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。除空白组外,其余各组按照高脂高糖辛辣饮食加免疫复合法+TNBS 结合乙醇复合造模法。用普通饲料喂养大鼠,自由饮用蜂蜜水(200 mL/kg),隔日灌服猪油(15 g/kg),并在灌服猪油次日按 20 mL/kg 灌服浓度为 52 度的红星二锅头白酒,共灌服 20 天。在高脂高糖饮食的基础上第

6 天和第 20 天,用含抗原 8 mg 的弗氏抗原乳化液 1 mL 于大鼠的双侧足跖、腹股沟及背部注射。在湿热蕴结证候模型制造成功后,各组大鼠在第 21 天禁食不禁水 24 h 后重建 UC 模型,即用 10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉后,将 TNBS 原液(0.02 mL/kg)加入 0.25 mL 50%的乙醇中,在距肛门 6 cm 处的肠腔内用规格为 2 mm×15 cm 的硅胶管缓慢注射药液,捏紧肛门,将大鼠倒置悬挂 8 min 即可。空白组用生理盐水 2.5 mL 缓慢注入距肛门约 6 cm 处的肠腔内,捏紧肛门,倒置 8 min。造模成功后次日开始灌胃给药,芍药汤高、中、低剂量组分别按 6 g/kg、12 g/kg、24 g/kg 芍药汤煎剂灌胃,SASP 组按 1 g/kg 剂量灌胃,使用同等体积生理盐水对空白组及模型组灌胃。每天 1 次,共进行 21 天。

1.5 各组大鼠结肠组织中 ZO-1 和 Occludin mRNA 及蛋白表达检测 灌胃给药第 21 天,取各组大鼠结肠组织病变最明显部位,一部分用于 Western-blot 法检测结肠组织中 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达,另一部分运用实时荧光 PCR 法检测结肠组织中 ZO-1 和 Occludin mRNA 表达。取样本于含 1 mL Trizol 的匀浆管中,提取总 RNA;总 RNA 中基因组 DNA 消除并除去 DNase1 后,加入 1 μL 的 Oligo(dT)18,1 μL 的 ddH₂O;65 °C 加热 10 min,结束后使之迅速冷却,谨防 RNA 二级结构的产生。反应程序:42 °C,60 min;70 °C,15 min;16 °C,hold,以此程序完成反转录。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,反应程序:95 °C,3 min;95 °C,5 s;56 °C,10 s;72 °C,25 s;39 个循环;65 °C,5 s;95 °C,50 s。以 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因相对表达量。引物序列见表 1。

将结肠组织研磨,在裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制,每 20 mg 组织加入 200 μL 配制好的裂解液,匀浆器匀浆直至完全裂解。裂解后的样品在 4 °C,12 000 ×g 的条件下离心 15 min,取上清备用,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书方法进行蛋白测定,一般浓缩胶 80 V,40 min,分离胶 120 V,50 min,当染料到达胶底部时即可终止电泳,进行下一步转膜。5%脱脂奶粉室温下将膜封闭 2 h。根据说明书稀释抗体,抗体加入封闭液中,和膜室温孵育 1 h。孵育一抗的膜用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min。按照 1:10 000 稀释 HRP 标记的二抗,与膜室温孵育 1 h。采用 ECL 化学发光检测,通过 TANONIS 软件读取相关条带灰度值。

表 1 各基因引物序列表

引物名称	序列	扩增片段大小(bp)
ZO-1	F-TTATTCCGCTTCATACAA; R-ATAGCCTCATCCTCATT	168
Occludin	F-CAGAGCCTATGGAACGG; R-CAAGGAAGCGATGAAGC	190
β-actin	F-CGTTGACATCCGTAAGAG; R-TAGGAGCCAGGGCAGTA	110

1.6 结肠黏膜损伤指数 (CMDI) 评分 分离结肠后, 沿结肠纵向剪开, 用 0.9%氯化钠注射液将残留粪便冲洗净, 洗净后立即进行肉眼损伤评价, 评分标准^[9]为: 结肠大体形态无粘连、无溃疡及炎症为 0 分; 轻度粘连、局部充血、无溃疡为 1 分; 重度粘连、1 处溃疡不伴充血或肠壁增厚为 2 分; 1 处溃疡伴炎症为 3 分; 大于 2 处溃疡伴炎症为 4 分; 大于 2 处溃疡和或炎症 > 1 cm 为 5 分。

1.7 统计学方法 应用 SPSS21.0 软件对实验结果及数据进行统计学分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用多样本单因素方差分析, 不符合正态分布及方差齐性的采用秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin mRNA 表达结果比较 见表 2。与空白组比较, 模型组中 ZO-1、Occludin mRNA 表达显著下降 (P < 0.01); 与模型组比较, 西药组中 ZO-1、Occludin mRNA 表达明显升高 (P < 0.01), 芍药汤各剂量组 ZO-1 mRNA 表达均显著提高 (P < 0.01), 芍药汤高、中剂量组 Occludin mRNA 表达显著提高 (P < 0.01)。

表 2 各组大鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin mRNA 表达结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ZO-1 mRNA	Occludin mRNA
空白组	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	6	0.15 ± 0.02 ^①	0.25 ± 0.05 ^①
低剂量组	6	0.23 ± 0.06 ^②	0.23 ± 0.02
中剂量组	6	0.31 ± 0.03 ^②	0.44 ± 0.03 ^②
高剂量组	6	0.49 ± 0.03 ^②	0.59 ± 0.04 ^②
西药组	6	0.54 ± 0.04 ^②	0.63 ± 0.03 ^②

与空白组比较, ①P < 0.01; 与模型组比较, ②P < 0.01

2.2 各组大鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 蛋白表达结果比较 见图 1、表 3。与空白组比较, 模型组中 ZO-1、Occludin 蛋白表达水平显著下降 (P < 0.01); 与模型组比较, 西药组中 ZO-1、Occludin 蛋白表达水平明显升高 (P < 0.01), 芍药汤各剂量组 ZO-1、Occludin 蛋白表达水平均显著提高 (P < 0.01), 其中以高剂量组最为明显。

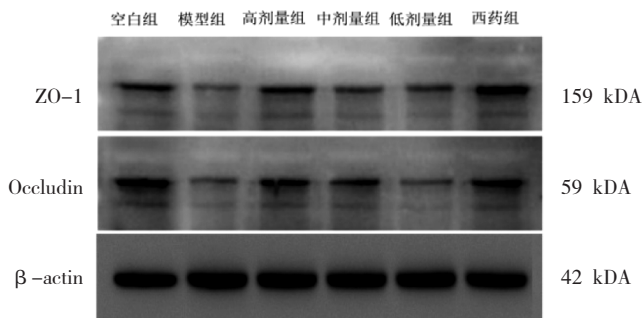


图 1 各组大鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 蛋白表达水平

表 3 各组大鼠结肠组织中 ZO-1 和 Occludin 蛋白的影响

组别	n	ZO-1	Occludin
空白组	6	0.49 ± 0.12	0.69 ± 0.15
模型组	6	0.21 ± 0.11 ^①	0.26 ± 0.13 ^①
低剂量组	6	0.36 ± 0.12 ^②	0.48 ± 0.11 ^②
中剂量组	6	0.35 ± 0.14 ^②	0.53 ± 0.15 ^②
高剂量组	6	0.52 ± 0.10 ^②	0.61 ± 0.16 ^②
西药组	6	0.44 ± 0.15 ^②	0.58 ± 0.11 ^②

与空白组比较, ①P < 0.01; 与模型组比较, ②P < 0.01

2.3 各组大鼠 CMDI 评分结果比较 见表 4。肉眼观察到空白组 UC 大鼠肠黏膜色泽红润, 表面光滑, 黏膜皱襞清晰, 肠壁无水肿、增厚。模型组大鼠肠黏膜可见溃疡形成, 病灶肠壁水肿明显, 大部分大鼠有肠粘连部分大鼠出现肠胀气。各治疗组大鼠结肠可见不同程度的水肿、增厚, 亦可见黏膜充血、出血, 黏膜皱襞略粗糙, 少部分大鼠出现肠粘连, 与空白组比较, 模型组 CMDI 评分显著提高 (P < 0.01), 与模型组比较, 各治疗组 CMDI 评分均显著下降 (P < 0.01), 其中以西药组最为明显。

表 4 各组大鼠 CMDI 评分结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CMDI 评分
空白组	8	0
模型组	8	4.1 ± 0.94 ^①
低剂量组	8	2.0 ± 0.82 ^②
中剂量组	8	2.8 ± 0.63 ^②
高剂量组	8	3.3 ± 1.05 ^②
西药组	8	1.6 ± 0.70 ^②

与空白组比较, ①P < 0.01; 与模型组比较, ②P < 0.01

3 讨论

UC 是一种非特异性结肠炎, 其明确病因尚存争论, 主要为大肠黏膜慢性溃疡性病变, 直肠黏膜、乙状结肠黏膜发病率较高, 严重时可扩展至左半结肠、右半结肠, 甚至全结肠和末端回肠, 其临床表现为腹痛、腹泻、大便中有黏液脓血, 病程缠绵反复常以加重期和缓解期交替进行为特征^[6-8]。目前临床上常应用糖皮质激素、免疫抑制剂、氨基水杨酸来治疗, 长期应用此类药物副作用大且疗效不明确。通过中医辨证论治施药可有效减轻症状, 提高患者生活质量且副作用较小^[9]。芍药汤出自金代刘完素的《素问病机气宜保命集》: “行血则便脓自愈, 调气则后重自除”。方中以黄芩、黄连为苦寒之药, 入大肠经, 是谓君药, 有清热燥湿解毒之功。芍药有和营止痛、当归兼有活血之功, 2 者相配以期行血而致脓便自愈之效。木香、槟榔功能行气消导, 四药相伍共为臣药, 气血顺畅则里急后重可愈。大黄可泻下活血、通腑去热, 使蕴藉肠道的湿热之邪随大便而出, 此法谓之通因通用。少佐肉桂取其温通之效, 可助归、芍行气和血, 又可降逆止呕, 防止拒药。炙甘草为佐

药, 调和诸药, 与臣药芍药相配共奏柔肝缓急止痛之功。诸药合和为用, 行气调血, 除后重利湿热, 清脓便止痛。本方功不在单纯止下痢, 其根本目的在于使药效直达致病之本。

研究表明当肠黏膜屏障功能的内环境平衡被打破时, 其主要表现为肠黏膜通透性增加, 肠黏膜的免疫水平随之降低, 加之外来抗原的刺激使炎症介质大量产生, 参与局部的炎症反应。随着炎症反应的加强可使肠黏膜的通透性进一步被破坏^[10-11]。肠黏膜屏障功能的破坏可以通过肠黏膜通透性的改变来反映^[12]。当一些脂多糖、内毒素等大分子物质通过通透性增加的肠黏膜进入组织内部可激发炎症反应, 使黏膜糜烂甚至使溃疡性疾病发生^[13]。

Occludin 蛋白作为最重要的蛋白质分子之一, 在肠黏膜通透性中发挥重要作用。ZO-1 是构成紧密连接的重要成分之一, 使许多跨膜蛋白和细胞质紧密连接蛋白连接起来构成紧密连接^[14]。上皮细胞通过 Occludin 蛋白封闭细胞间隙, 并与 ZO-1 等结合形成紧密连接的基础结构^[15]。2 者相互作用后, 将跨膜蛋白和细胞骨架连接在一起, 改变了细胞内外的信号转导途径, 加强了肌动蛋白收缩性, 影响细胞间紧密连接结构, 调节其通透性^[16]。Hermiston ML 等^[17]研究发现通过敲除 Occludin 蛋白的基因可使小鼠发生炎症性肠炎。在患有 UC 和克罗恩病的患者中无论是从 Occludin mRNA 还是从蛋白含量的角度观察, 其数值均明显下降^[18]。李茹柳等^[19]研究表明 UC 大鼠病变严重程度与 Occludin 蛋白含量成负相关。

本研究表明, 湿热蕴结型 UC 模型大鼠的 Occludin 与 ZO-1 无论 mRNA 还是蛋白含量均低于空白组大鼠。应用芍药汤干预后可发现 Occludin 与 ZO-1 的 mRNA 和蛋白含量均显著提高, 其中以高剂量组最为明显。芍药汤可以通过提高 Occludin、ZO-1 蛋白含量使被破坏的肠黏膜通透性得以恢复, 使肠黏膜的屏障功能得到重建, 实现治疗 UC 的目的。

[参考文献]

- [1] 李鹤才, 莫林洁. 中医药治疗溃疡性结肠炎的临床研究进展[J]. 广西中医药, 2017, 40(2): 9-12.
- [2] 田慧, 赵红靓, 杨琳, 等. 肠道微生态与肠黏膜屏障研究进展[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(3): 418-421.
- [3] Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tightjunctions molecular architecture and function[J]. International Review of Cytology, 2006, 248: 261-298.
- [4] 张文远, 姜伟伟. 白头翁醇提取物对大鼠结肠炎肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(30): 3134-3139.
- [5] Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Laboratory Investigation, 1993, 69(2): 238-249.
- [6] Bannwart CF, Nakaira-Takahagi E, Golim MA, et al. Downregulation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) pathway by silibinin in human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*[J]. Life Sciences, 2010, 86(23-24): 880-886.
- [7] Hanauer SB, Dassopoulos T. Evolving Treatment Strategies for Inflammatory Bowel Disease[J]. Annual Review of Medicine, 2001, 52(1): 299-318.
- [8] Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2002, 359(9303): 331-340.
- [9] 徐艳娇, 黄幼兰, 吴涛, 等. 中药治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 药品评价, 2014, 11(24): 23, 26-28, 31.
- [10] Stange EF. Improvement of a 'Leaky' Intestinal Barrier[J]. Dig Dis, 2017, 35(1-2): 21-24.
- [11] 吴丹明. 中医药治疗溃疡性结肠炎的机理研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(9): 103-105.
- [12] 孙博云, 王师英, 胡鸿毅. 肠黏膜通透性改变与炎症性肠病关系的研究进展[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(11): 891-894.
- [13] Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, et al. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia[J]. Journal of Cell Biology, 1986, 103(3): 755-766.
- [14] Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications[J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2007, 23(4): 379.
- [15] 张宇飞. Occludin 蛋白调控机制及临床意义的研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2010, 17(3): 175-178.
- [16] 卢璐, 谢建群, 郭春荣. 中药清肠栓对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(22): 2322-2327.
- [17] Hermiston ML, Gordon JL. Inflammatory Bowel Disease and Adenomas in Mice Expressing a Dominant Negative N-Cadherin[J]. Science, 1995, 270(5239): 1203-1207.
- [18] Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, et al. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins[J]. American Journal of Pathology, 2001, 159(6): 2001-2009.
- [19] 李茹柳, 迟莉, 郭文峰, 等. 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.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)