

藿香正气口服液对 DSS 诱导结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护作用及机制研究

刘瑶, 卢素宏, 林华景(广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520)

摘要: **目的** 探讨藿香正气口服液对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护作用及机制。**方法** 将 32 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组、DSS 模型组、藿香正气口服液组($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)和柳氮磺吡啶组(SASP, $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。灌胃给药, 给药体积 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每日 1 次, 连续 8 d。给药第 2 天开始, 采用 2% DSS 连续干预 7 d 建立急性结肠炎小鼠模型。给药干预后, 测定小鼠体质量、结肠长度、疾病活动指数(DAI); 采用 HE 染色法观察结肠组织的病理学变化并计算病理评分; 采用 ELISA 法测定血清中炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)1 β (IL-1 β)、IL-6 及 IL-10 的含量; 采用偶氮基质显色法测定血清中脂多糖(LPS)的含量; 采用异硫氰酸荧光素(FITC-D)标记的右旋葡聚糖法以及肠系膜淋巴结细菌移位率来检测结肠黏膜通透性; 采用免疫荧光染色法检测结肠组织中紧密连接蛋白 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白的表达。**结果** 与正常对照组比较, DSS 模型组小鼠的体质量从第 3 天开始持续降低($P<0.05$, $P<0.01$), 结肠长度明显缩短($P<0.01$), DAI 评分明显升高($P<0.01$); 结肠组织病理评分显著升高($P<0.01$); 血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平明显升高($P<0.01$), 而 IL-10 水平明显降低($P<0.01$); 血清 LPS 含量、结肠黏膜 FITC-D 渗透率以及细菌移位率均显著升高($P<0.01$); 结肠组织中紧密连接蛋白 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白表达减弱。与 DSS 模型组比较, 藿香正气口服液组小鼠的体质量有所回升($P<0.05$, $P<0.01$), 结肠长度明显延长($P<0.05$), DAI 评分明显降低($P<0.05$); 结肠组织病理评分显著降低($P<0.01$); 血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 而 IL-10 水平明显升高($P<0.01$); 血清 LPS 含量、结肠黏膜 FITC-D 渗透率及细菌移位率均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 结肠组织中紧密连接蛋白 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白表达增强。**结论** 藿香正气口服液可降低 DSS 诱导的结肠炎模型小鼠肠黏膜的通透性, 对结肠炎小鼠的肠黏膜屏障具有保护作用。

关键词: 藿香正气口服液; 葡聚糖硫酸钠; 结肠炎; 肠黏膜屏障; 结肠黏膜通透性; 紧密连接相关蛋白; Claudin-1; ZO-1; 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)04-0473-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.04.004

Study on the Protective Effect and Mechanism of *Huoxiang Zhengqi* Oral Liquid on Intestinal Mucosal Barrier in Colitis Mice Induced by DSS

LIU Yao, LU Suhong, LIN Huajing (Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect and mechanism of *Huoxiang Zhengqi* oral liquid on intestinal mucosal barrier in colitis mice induced by DSS. **Methods** 32 C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, DSS model group, *Huoxiang Zhengqi* oral liquid group ($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) and salazosulfapyridine group (SASP, $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Intragastric administration was performed with the dosage of $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ once a day for 8 consecutive days. Acute colitis mouse model was established by 2% DSS intervention for 7 d. The body mass, colon length and disease activity index (DAI) of mice were measured after the intervention. Pathological changes of colon tissues were observed by HE staining method and pathological scores were calculated. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), IL-6 and IL-10 were determined by ELISA. The content of lipopolysaccharide (LPS) in serum was determined by azo matrix chromogenic method. The permeability of intestinal mucosa was measured by FITC-labelled dextran method and bacterial translocation. The protein expression levels of

收稿日期: 2020-07-19

作者简介: 刘瑶, 女, 博士, 副主任中药师, 研究方向: 中药复方药理。Email: liuyao5051@sina.com。

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20191236); 广东食品药品职业学院自然科学项目(2016YZ004)。

Claudin-1 and ZO-1 were measured by immunofluorescence staining. **Results** Compared with the normal control group, the body mass of the DSS model group decreased continuously from the 3rd day ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the colon length was significantly shortened ($P < 0.01$), and DAI score was significantly increased ($P < 0.01$). The histopathological score of colon was significantly increased ($P < 0.01$). The serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels were significantly increased ($P < 0.01$), while IL-10 levels were significantly decreased in colon tissues ($P < 0.01$). The serum LPS content, colonic mucosa FITC-D permeability and bacterial translocation rate were significantly increased ($P < 0.01$). The expression of Claudin-1 and ZO-1 proteins in colon tissue was decreased. Compared with the DSS model group, the body mass of mice in the *Huoxiang Zhengqi* oral liquid group was improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the colon length was significantly increased ($P < 0.05$), and DAI score was significantly decreased ($P < 0.05$). The serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while IL-10 levels were significantly increased ($P < 0.01$). The serum LPS content, colonic mucosa FITC-D permeability and bacterial translocation rate were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of Claudin-1 and ZO-1 proteins was increased in colon tissue. **Conclusion** *Huoxiang Zhengqi* oral liquid can reduce the permeability of intestinal mucosa in colitis mice induced by DSS, and has a protective effect on the intestinal mucosal barrier in mice with colitis.

Keywords: *Huoxiang Zhengqi* oral liquid; sodium glucan sulfate; colitis; intestinal mucosal barrier; colonic mucosal permeability; tight junction protein; Claudin-1; ZO-1; mice

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD),是以慢性、顽固性发作、病因不明为特征的一种特发性肠道炎症性疾病,临床的典型症状包括黏液脓血便和腹痛、腹泻^[1]。虽然IBD的发病原因和发病机制尚不明确,但目前一般认为是由遗传因素、免疫功能紊乱、肠道屏障功能障碍及肠道菌群改变等多种因素所致。近年来在世界范围内IBD的发病率和死亡率逐年上升,且至今尚无理想的治疗手段。目前常用的IBD治疗药物有氨基水杨酸类、糖皮质激素、免疫抑制剂等^[2],然而由于副作用、经济因素等,不利于临床应用。因此寻找安全、有效、经济的IBD治疗药物具有重要意义。

藿香正气制剂源自宋代的《太平惠民和剂局方》,具有解表化湿、理气和中的功效,临床上广泛用于各种胃肠炎疾病^[3-5]。本课题组前期开展了藿香正气液对感染后肠易激综合征(PI-IBS)大鼠肠黏膜屏障保护与调节作用及其机制的研究^[6],结果表明藿香正气口服液可通过修复受损的肠黏膜上皮细胞的超微结构,降低肠道通透性,保护肠黏膜机械屏障,发挥对PI-IBS免疫屏障的调节作用。本研究拟通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠结肠炎模型,探讨藿香正气口服液对结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 C57BL/6 小鼠, 32 只, SPF 级,

9~12 周龄, 体质量 20~22 g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(粤)2016-0041。

1.2 药物及试剂 藿香正气口服液, 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司, 批号: Z50020409; 柳氮磺吡啶(SASP), 上海福达制药有限公司, 批号: C14202004422。葡聚糖硫酸钠(DSS, MW: 36 000~50 000), 美国 MP Biomedicals 生物医学有限公司, 批号: 160110; 异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FITC-D), 美国 Sigma 公司, 批号: 46944; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号: ab208348)、白细胞介素(IL)1 β (IL-1 β , 批号: ab197742)、IL-6(批号: ab100712)、IL-10(批号: ab108870)ELISA 试剂盒以及一抗 Claudin-1(批号: ab15098)、ZO-1(批号: ab96587)多克隆抗体, 均购自英国 Abcam 公司; 显色基质法鲎试剂盒, 厦门市鲎试剂实验厂有限公司, 批号: 180506。

1.3 主要仪器 HM-315 型旋转切片机, 德国 MICON 公司; RMZ135 型石蜡切片机, 德国 Meidx 公司; OLYMPUS-IX71 型多功能倒置电子显微镜、激光共聚焦显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; F-380 型荧光分光光度计, 天津港东科技股份有限公司; ThermoFisher FC 型全波长多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司。

1.4 分组、造模及给药 将 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为正常对照组、DSS 模型组、SASP 组(阳性对照组, 1.5 g·kg⁻¹, 相当于成人临床剂量的 15 倍)以

及藿香正气口服液组($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 原液,相当于成人临床剂量的 10 倍),每组 8 只。藿香正气口服液组和 SASP 组按上述剂量灌胃给药,给药体积 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,正常对照组及 DSS 模型组灌胃给予等量生理盐水,每日 1 次,连续 8 d。参照 Cooper HS 等^[7]的方法建立 DSS 小鼠结肠炎模型。给药第 2 天开始,将 DSS 溶于蒸馏水中配制成质量分数为 2% 的 DSS 溶液,以替代饮用水让小鼠自由饮用,每天更换,连续 7 d,直至实验结束。

1.5 小鼠一般情况观察 观察并记录各组小鼠的活动、饮食、精神状况、粪便状态以及体质量变化等情况,并进行大便隐血试验。参考 Cooper HS 等^[7]的疾病活动指数(DAI)评价标准,根据体质量下降百分比、大便隐血、大便秘结等 3 项指标进行评分。

1.6 小鼠结肠黏膜的通透性检测 动物禁食禁水 4 h,给予 FITC-D($0.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,4 h 后心脏穿刺取血,以 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取血清,采用荧光分光光度计检测每个样本血清中的 FITC-D 浓度。

1.7 样本采集及结肠组织病理学观察 将小鼠麻醉后,摘眼球取血,收集血液,以 $3\,000\times g$ 离心 15 min,分离血清,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。处死小鼠后,将其用止血钳固定在操作台上,以无菌操作迅速剖开腹腔,观察肠黏膜颜色、肠道蠕动等。小心游离出结肠和远端回肠,取出盲肠末端至肛门整个肠段,观察、对比各组结肠的外观形态,并测量结肠长度。取距肛门处 2 cm 的结肠组织,置于 10% 中性甲醛溶液浸泡固定 24 h 后,常规石蜡包埋,连续切片($4\text{ }\mu\text{m}$),进行 HE 染色;在光学显微镜下观察肠黏膜病理变化,并进行组织病理学评分^[8];将炎症细胞的渗出和组织损伤计分相加,计算出结肠组织病理评分。

1.8 偶氮基质显色法测定血清 LPS 含量 心脏穿刺取血,以 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取血清,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存。采用偶氮基质显色法,按照试剂盒说明书步骤操作,测定血清 LPS 含量。

1.9 肠系膜淋巴结细菌移位率检测 采用无菌剪刀剪取小鼠的全部肠系膜淋巴结,称定质量后匀浆处理,将 0.1 mL 匀浆组织分别涂在普通琼脂培养基上,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养 24 h。结果计算:细菌移位率($\%$)=(阳性样本量/总样本量) $\times 100\%$ 。

1.10 ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 含量 取小鼠血清,按照试剂盒说明书步骤操作,采用 ELISA 法检测小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 含量。

1.11 免疫荧光染色法检测结肠组织 Claudin-1、ZO-1 蛋白表达 将新鲜的小鼠结肠组织以石蜡包埋,

$8\text{ }\mu\text{m}$ 厚度连续冰冻组织切片、脱水、固定、透膜、封闭后,室温放置 1 h,加入小鼠抗紧密连接蛋白 Claudin-1 及 ZO-1 多克隆抗体(用 PBS 替代一抗作阴性对照), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;以 PBS 漂洗,滴加标记红色荧光的抗兔 DyLight 649,室温避光孵育 1 h;PBS 漂洗后,滴加 DAPI 染核,在荧光显微镜下观察各细胞间紧密连接的分布并拍照,显示红色荧光为阳性表达。

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;进行正态性及方差齐性检验,若满足正态性及方差齐性则多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 t 检验,若不满足则采用非参数检验;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 藿香正气口服液对 DSS 诱导结肠炎小鼠体质量、结肠长度及 DAI 评分的影响 结果见图 1。实验过程中观察到,正常对照组小鼠的粪便形态未见明显异常,DSS 模型组小鼠出现腹泻、肉眼血便、脓便等症状,藿香正气口服液组小鼠的稀便和血便情况明显改善。与正常对照组比较,DSS 模型组小鼠的体质量从第 3 天开始持续降低($P<0.05$, $P<0.01$),结肠长度明显缩短($P<0.01$),DAI 评分明显升高($P<0.01$)。与 DSS 模型组比较,藿香正气口服液组及 SASP 组小鼠的体质量有所回升($P<0.05$, $P<0.01$),结肠长度明显延长($P<0.05$),DAI 评分明显降低($P<0.05$)。

2.2 藿香正气口服液对 DSS 诱导的结肠炎小鼠结肠组织病理学的影响 结果见图 2。正常对照组小鼠的结肠黏膜完整、光滑,腺体层次清楚,未见溃疡、糜烂及炎性细胞浸润;DSS 模型组小鼠结肠黏膜上皮糜烂,腺体隐窝结构破坏,杯状细胞丢失,伴有中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞等大量炎性细胞浸润;藿香正气口服液组小鼠的结肠黏膜损伤明显减轻,腺体隐窝排列较整齐,上皮结构较完整,炎性细胞浸润减少。与正常对照组比较,DSS 模型组小鼠的结肠组织病理评分显著升高($P<0.01$);与 DSS 模型组比较,藿香正气口服液组及 SASP 组小鼠的结肠组织病理评分显著降低($P<0.01$)。结果表明,藿香正气口服液能够改善 DSS 诱导的结肠组织损伤。

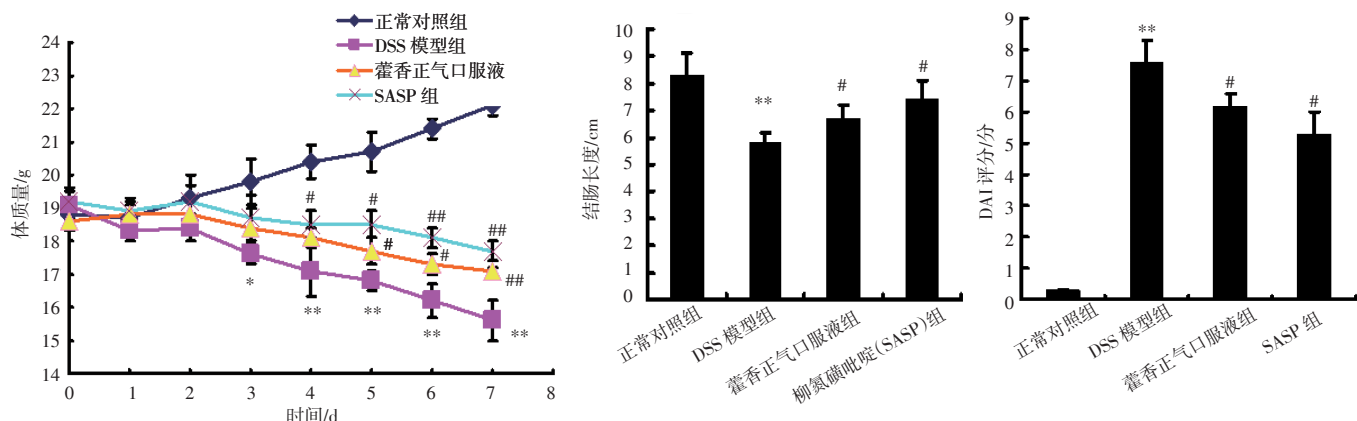
2.3 藿香正气口服液对 DSS 诱导结肠炎小鼠血清炎症因子水平的影响 结果见图 3。与正常对照组比较,DSS 模型组小鼠的血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平明显升高($P<0.01$),而 IL-10 水平明显降

低($P < 0.01$)。与 DSS 模型组比较, 藿香正气口服液组及 SASP 组小鼠的血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 IL-10 水平明显升高($P < 0.01$)。结果表明, 藿香正气口服液能够有效抑制 DSS 诱导的结肠炎发病过程中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌, 增加抗炎因子 IL-10 的分泌, 从而改善局部促炎/抗炎因子的失衡状态。

2.4 藿香正气口服液对 DSS 诱导结肠炎小鼠血清 LPS、细菌移位率及 FITC-D 渗透性的影响 结果见图 4。与正常对照组比较, DSS 模型组小鼠的血清 LPS 含量、结肠黏膜 FITC-D 渗透性以及细菌移位率

均显著升高($P < 0.01$); 与 DSS 模型组比较, 藿香正气口服液组及 SASP 组小鼠的血清 LPS 含量、结肠黏膜 FITC-D 渗透性及细菌移位率均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, 藿香正气口服液能够降低 DSS 诱导的结肠炎小鼠肠黏膜的通透性。

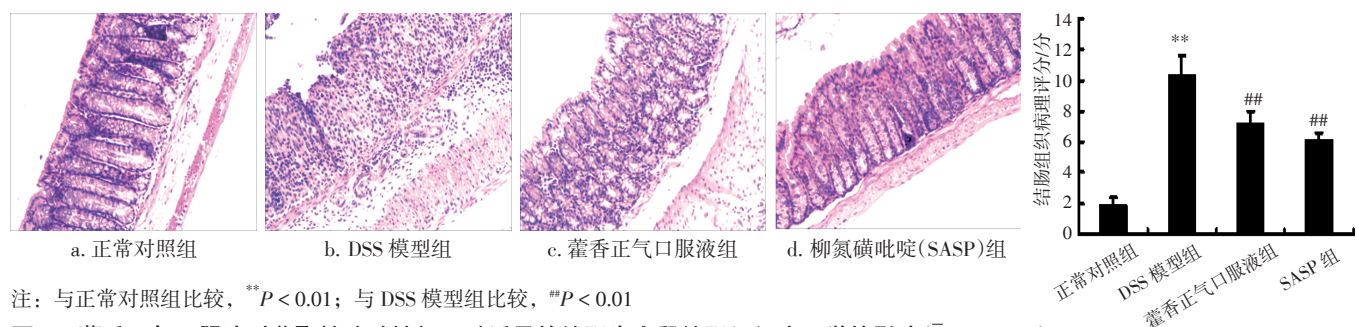
2.5 藿香正气口服液对 DSS 诱导结肠炎小鼠的结肠黏膜 Claudin-1、ZO-1 蛋白表达的影响 结果见图 5。在荧光显微镜下可见 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白均呈红色光亮。正常对照组可见 Claudin-1、ZO-1 蛋白红色荧光在结肠细胞与细胞连接处呈连续性分布, 边缘光滑, 红色显色面积较大, 荧光强度较



注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DSS 模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 1 藿香正气口服液对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎小鼠体重、结肠长度及疾病活动指数(DAI)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

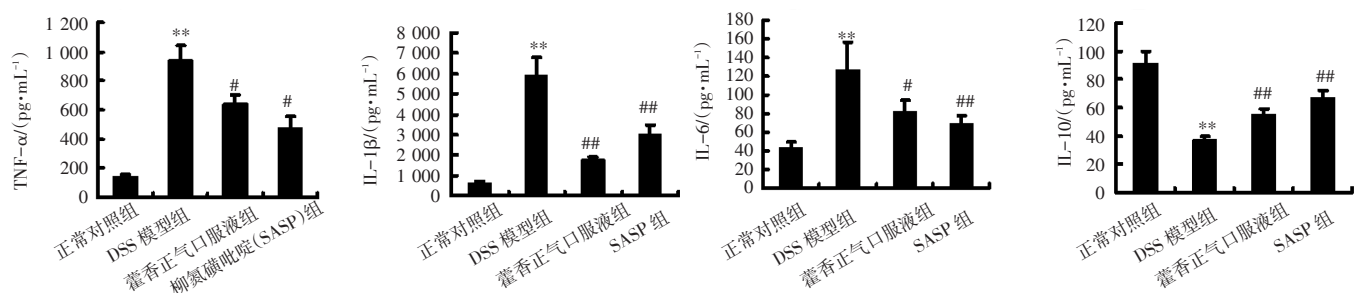
Figure 1 The effects of *Huoxiang Zhengqi* oral liquid on body mass, colon length and DAI evaluation in colitis mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 DSS 模型组比较, ## $P < 0.01$

图 2 藿香正气口服液对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎小鼠结肠组织病理学的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

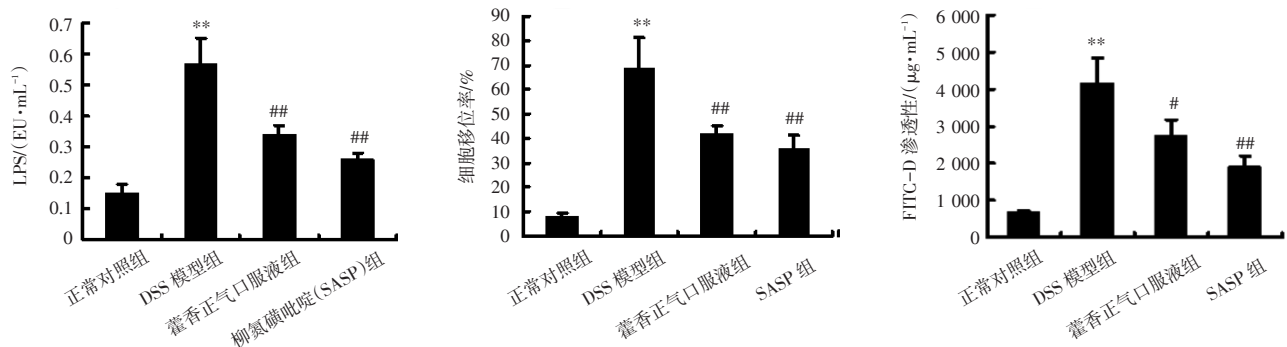
Figure 2 The effect of *Huoxiang Zhengqi* oral liquid on colonic histopathology of colitis mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DSS 模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 3 藿香正气口服液对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎小鼠血清炎症因子水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

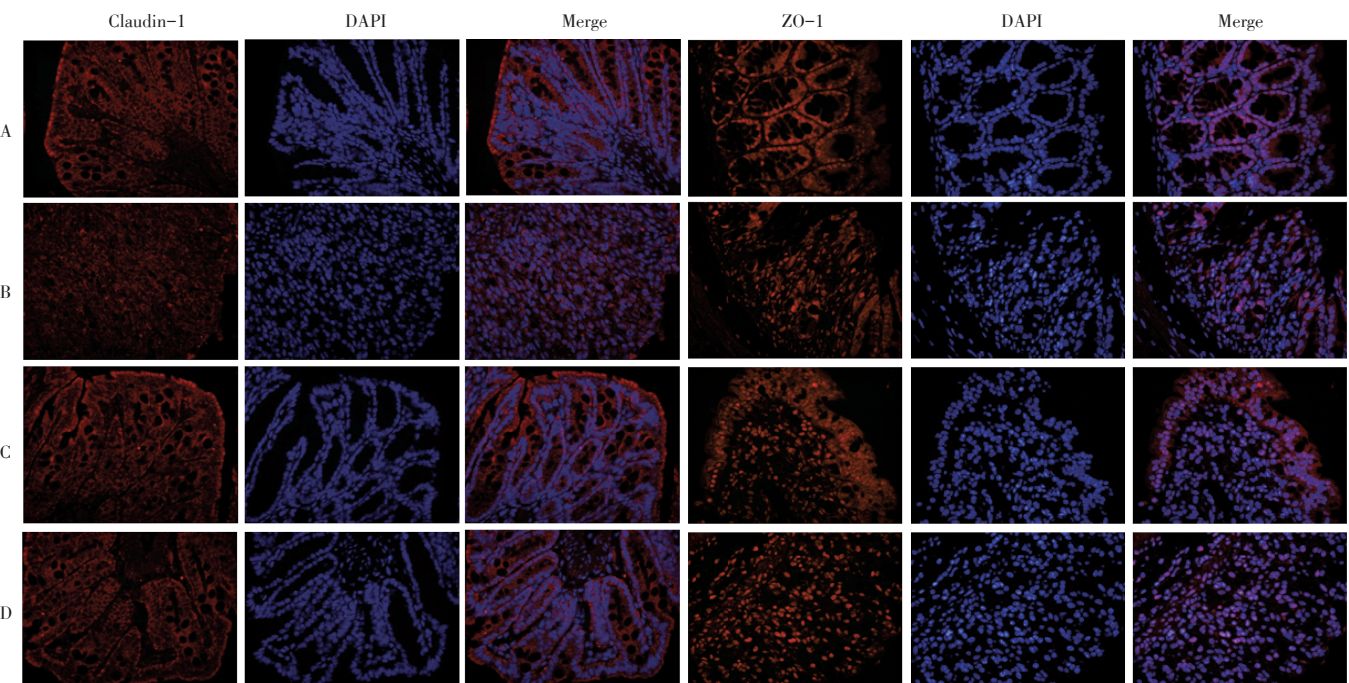
Figure 3 The effect of *Huoxiang Zhengqi* oral liquid on serum inflammatory factors in colitis mice induced by DSS ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注: ** $P < 0.01$; 与 DSS 模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 藿香正气口服液对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎小鼠血清脂多糖(LPS)、细菌移位率及 FITC-D 渗透性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 4 The effects of *Huoxiang Zhengqi* oral liquid on serum LPS, bacterial translocation rate and FITC-D permeability in colitis mice induced by DSS($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注: A. 正常对照组; B. DSS 模型组; C. 藿香正气口服液组; D. 柳氮磺吡啶(SASP)组

图 5 藿香正气口服液对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎小鼠结肠组织中 Claudin-1、ZO-1 蛋白定位分布的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Figure 5 The effect of *Huoxiang Zhengqi* oral liquid on the localization and distribution of Claudin-1 and ZO-1 proteins in colonic tissues of mice with colitis induced by DSS(IF, $\times 400$)

强。DSS 模型组可见结肠组织细胞与细胞紧密连接处的红色荧光分布不连续、不整齐且较零乱, 边缘粗糙呈锯齿状, 同时红色显色面积减少且荧光强度减弱。与 DSS 模型组比较, 藿香正气口服液组可见 Claudin-1、ZO-1 蛋白红色荧光在结肠细胞与细胞连接处沿细胞膜分布, 呈连续性分布, 边缘较光滑, 红色显色面积有所增加, 且红色荧光强度增强。

3 讨论

炎症性肠病(IBD)是一种病因不明的慢性肠道炎症性疾病, 以肠道炎症和肠黏膜损伤为主要特征。

研究^[9]认为, 肠黏膜通透性增加可能是溃疡性结肠炎发病的始动因素, 保护肠道黏膜屏障, 降低其通透性可能为结肠炎的治疗提供重要思路。本课题组前期研究^[6]发现, 藿香正气液具有保护肠黏膜机械屏障, 调节免疫屏障的药理作用。本研究通过探讨藿香正气口服液对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护作用及机制, 以期 IBD 的治疗药物开发提供参考。

DSS 诱导的结肠炎动物模型被广泛应用于 IBD 相关疾病的研究^[10-11]。本研究结果表明, 小鼠自由饮用 2% 的 DSS 溶液 7 d 后, 可导致体质量下降, 大便

性状改变,出现潜血甚至血便,疾病活动指数(DAI)升高,结肠明显缩短,结肠黏膜出现多发性糜烂或浅表性溃疡,结肠隐窝变形。而藿香正气口服液干预能减轻DSS诱导的结肠炎小鼠的一般症状,改善结肠黏膜的病理损伤,降低因炎症而导致的结肠长度缩短,表明藿香正气口服液对DSS诱导的结肠炎有一定的治疗作用。

IBD患者肠道内存在多种炎性细胞,而炎性细胞活化后释放的一系列炎性介质作用于肠道的神经末梢以及内分泌-运动感受器,从而引起各种肠道症状。细胞因子由活化的免疫细胞合成和分泌,参与免疫过程,抑炎介质和促炎介质之间的比例失调可引起炎症的发生。本研究结果显示,藿香正气口服液可以抑制促炎因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的分泌,上调抗炎因子IL-10的表达,从而改善局部促炎/抗炎因子的失衡状态。这可能是藿香正气口服液保护IBD小鼠肠黏膜屏障的作用机制之一。

肠上皮细胞是肠黏膜屏障的主要组织结构基础,而紧密连接是肠上皮细胞间最重要的连接方式。IBD肠黏膜屏障通透性增高,紧密连接蛋白受损,使得细菌、病毒、有害物质等容易透过细胞之间连接的机械屏障,对机体的免疫系统不断进行刺激,引起免疫功能紊乱,最终加剧溃疡性结肠炎(UC)的发展^[12-13]。紧密连接蛋白在上皮细胞的分化以及维持和调节结肠黏膜上皮紧密连接功能中起着重要作用,检测其表达水平不仅可以反映肠道屏障的破坏情况,同时也反映了肠道屏障的恢复程度。肠黏膜上皮细胞紧密连接的相关蛋白,主要有Occludin、Claudin、ZO蛋白等。其中,Claudin是跨膜蛋白,其细胞外部分与相邻细胞的跨膜连接蛋白相互作用,封闭细胞间隙;而细胞内部分与ZO家族相连,主要包括ZO-1,ZO-2和ZO-3等3个亚型,对紧密连接的形成起到装配平台样作用。ZO-1通常位于多种上皮细胞和内皮细胞间的闭锁小带中,能与其同源体ZO-2、ZO-3一起,为紧密连接的许多跨膜蛋白和胞质附着蛋白连接在一起提供支架,构成紧密连接的重要成分之一^[14]。本实验选择紧密连接蛋白中的Claudin-1、ZO-1作为考察指标,其在肠黏膜上皮细胞中的表达下调,表明肠黏膜屏障通透性增高,肠黏膜屏障功能受损。本实验研究结果表明,DSS结肠炎小鼠肠黏膜紧密连接蛋白Claudin-1、ZO-1及细胞骨架蛋白分布异常,使其不能锚定在紧密连接处。与模型组相比较,藿香正气口服液组的荧光强度明显增强,且中断的荧光信号得到一定修复。

结果提示,藿香正气口服液可能通过增强小鼠结肠组织Claudin-1、ZO-1的表达,修复肠黏膜紧密连接,从而改善肠黏膜屏障的通透性。

综上所述,藿香正气口服液能够改善DSS诱导的结肠炎小鼠的一般症状,抑制炎症细胞浸润,修复肠黏膜组织的病理损伤;可能与其改善局部促炎/抗炎因子失衡状态,增强结肠组织Claudin-1和ZO-1紧密连接蛋白的表达,保护肠黏膜机械屏障功能,从而降低肠黏膜的通透性有关。

参考文献:

- [1] FLYNN S, EISENSTEIN S. Inflammatory bowel disease presentation and diagnosis[J]. Surg Clin North Am, 2019, 99(6): 1051-1062.
- [2] SANDS B E, CHEIFETZ A S, NDUAKA C I, et al. The impact of raising the bar for clinical trials in ulcerative colitis[J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(9): 1217-1226.
- [3] 谢肄聪, 唐方. 藿香正气软胶囊对肠屏障功能保护作用的机理研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 456-458.
- [4] 赵宏杰, 郭利平, 杨丰文, 等. 藿香正气方治疗胃肠型感冒有效性和安全性系统评价[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1495-1499.
- [5] 龚梦鹃, 李春苑, 巫圣乾, 等. 藿香正气口服液干预湿困脾胃证大鼠的血清和粪便代谢组学研究[J]. 中草药, 2017, 48(14): 2889-2894.
- [6] 刘瑶, 刘伟, 余林中. 藿香正气液对感染后肠易激综合征大鼠结肠上皮细胞超微结构及血清DAO活性的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(9): 2104-2107.
- [7] COOPER H S, MURTHY S N, SHAH R S, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-49.
- [8] CHEN K C, CHANG S S, HUANG H J, et al. Three-in-one agonists for PPAR- α , PPAR- γ , and PPAR- δ from traditional Chinese medicine[J]. J Biomol Struct Dyn, 2012, 30(6): 662-83.
- [9] 赵红伟, 岳月红, 康薇. 银杏叶提取物对肠炎小鼠肠黏膜通透性的影响[J]. 中国医药导报, 2016, 13(25): 8-11, 181.
- [10] NI J, CHEN S F, HOKKANDER D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes[J]. Gut, 1996, 39(2): 234-41.
- [11] HU Q, REN H, LI G, et al. STING-mediated intestinal barrier dysfunction contributes to lethal sepsis[J]. EBioMedicine, 2019, 41: 497-508.
- [12] NUNES C, FREITAS V, ALMEIDA L, et al. Red wine extract preserves tight junctions in intestinal epithelial cells under inflammatory conditions: implications for intestinal inflammation[J]. Food Funct, 2019, 10(3): 1364-1374.
- [13] ZHAO H W, YUE Y H, HAN H, et al. Effect of toll-like receptor 3 agonist poly I: C on intestinal mucosa and epithelial barrier function in mouse models of acute colitis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(6): 999-1009.
- [14] 顾鉴秋, 邵梦茹, 陈家艺, 等. 肠炎清口服液改善小鼠溃疡性结肠炎肠道黏膜通透性的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 133-136.

(编辑: 邹元平)