

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230803

痛泻要方对肝郁脾虚型UC大鼠结肠组织Claudin-1、ZO-1及血清COX-2、iNOS表达的影响

樊俐慧¹, 朱向东², 杨霞¹, 王志刚^{3✉}

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 宁夏医科大学, 宁夏回族自治区 银川 750000;
3. 天水市中医医院, 甘肃 天水 741000)

【摘要】目的:探讨痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)模型大鼠血清中环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)含量及结肠组织中密封蛋白1(Claudin-1)、紧密连接蛋白1(ZO-1)基因及蛋白表达的影响。方法:100只Wistar大鼠用病-证结合法复建肝郁脾虚型UC模型,按随机数字表法将造模组大鼠分为模型组(10 g/kg蒸馏水灌胃),美沙拉嗪组(0.4 g/kg美沙拉嗪灌胃),痛泻要方高、中、低剂量组(20.8、10.4、5.2 g/kg痛泻要方灌胃),每组20只。另取20只正常大鼠作为空白组(10 g/kg蒸馏水灌胃),各组灌胃体积均为10 mL/kg,连续21 d。药物治疗结束后,取血清及结肠组织,ELISA法检测血清中COX-2、iNOS含量;观察结肠组织大体形态及损伤情况,HE染色观察病理表现,RT-qPCR法检测Claudin-1、ZO-1 mRNA表达,免疫组化法和Western blot法检测Claudin-1、ZO-1平均光密度值及蛋白表达。结果:光镜观察显示,模型组大鼠结肠黏膜充血、水肿,炎性细胞浸润,细胞间紧密连接断裂;经痛泻要方干预后,大鼠结肠黏膜病理变化明显改善,细胞间紧密连接正常。与空白组比较,模型组大鼠血清中COX-2、iNOS含量明显升高($P < 0.01$);Claudin-1、ZO-1 mRNA、平均光密度值和蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组COX-2、iNOS含量降低($P < 0.01$);痛泻要方高、中剂量组COX-2、iNOS含量显著降低($P < 0.01$),痛泻要方低剂量组COX-2、iNOS含量降低($P < 0.05$);美沙拉嗪组及痛泻要方高、中剂量组Claudin-1、ZO-1 mRNA平均光密度值及蛋白表达量显著升高($P < 0.01$);痛泻要方低剂量组Claudin-1、ZO-1 mRNA表达量与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);痛泻要方低剂量组Claudin-1、ZO-1平均光密度值升高($P < 0.05$),蛋白表达升高($P < 0.01, P < 0.05$)。结论:痛泻要方治疗肝郁脾虚型UC的作用可能与上调关键蛋白Claudin-1、ZO-1的表达量及降低炎症细胞因子COX-2、iNOS的含量有关。

【关键词】痛泻要方;溃疡性结肠炎;密封蛋白1;紧密连接蛋白1;环氧合酶-2;诱导型一氧化氮合酶

【引用格式】

樊俐慧,朱向东,杨霞,等.痛泻要方对肝郁脾虚型UC大鼠结肠组织Claudin-1、ZO-1及血清COX-2、iNOS表达的影响[J].中医药信息,2023,40(8):15-22.

FAN L H, ZHU X D, YANG X, et al. Effect of Tongxie Yaofang on Claudin-1 and ZO-1 in colon tissues and COX-2 and iNOS in serum of UC rats with liver depression and spleen deficiency[J]. Information on TCM, 2023, 40(8):15-22.

基金项目:国家自然科学基金项目(8167150826)

第一作者简介:樊俐慧(1992-),女,博士研究生,主要研究方向:糖尿病及其并发症的中医药防治。

✉通信作者简介:王志刚(1965-),男,主任医师,主要研究方向:糖尿病及其并发症的中医药防治。

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是最常见的胃肠道疾病之一,属于一种慢性复发性炎症,会对结肠黏膜造成损害^[1]。流行病学研究表明^[2], UC的发病率在我国呈明显增长趋势,该病发病机制主要涉及遗传易感性,上皮屏障缺陷,酶因素,免疫反应失调和环境因素等。课题组前期研究发现,痛泻要方对UC大鼠结肠黏膜免疫具有良好的调节作用,并可调节部分肠道菌群,肠道菌群紊乱可激发肠上皮细胞未折叠蛋白反应(UPR)途径介导的内质网应激(ERS),使肠黏膜屏障损伤及诱发肠黏膜免疫功能紊乱。本研究进一步探讨痛泻要方对肝郁脾虚型UC大鼠结肠组织中密封蛋白1(Claudin-1),紧密连接蛋白1(ZO-1)的表达量及血清中环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2),诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)含量的影响,分析肠黏膜损伤与肠黏膜免疫的相关性,为寻找治疗UC作用的新靶点提供实验支撑。

1 材料

1.1 动物

120只Wistar大鼠,雌雄各半,80天龄,体质量(200±20)g,由甘肃中医药大学科研实验动物中心提供,合格证号:SCXK(甘)2015-0002。分笼饲养在甘肃中医药大学实验动物中心SPF级屏障实验室,室温21~25℃,湿度50%~60%,光照12h明暗交替,噪声<50dB,使用许可证号:SYXK(甘)2015-0005。本实验经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准,伦理批准编号:2019-095。

1.2 药物及制备

痛泻要方组方:炒白术30g,炒白芍30g,炒陈皮22.5g,防风15g,购自兰州惠仁堂大药房,由甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定为合格。制备方法:将各味中药按处方比例称量,加入药材10倍量的蒸馏水浸泡30min,煎煮30min,过滤,再加药材5倍量的蒸馏水煎煮20min,过滤,将两次药液合并混匀,浓缩成含生药1g/mL的汤剂,装于玻璃瓶中,压盖,置于4℃冰箱保存备用。美沙拉嗪肠溶片(黑龙江天宏药业股份有限公司,批号:H20103359)充分研磨,所得粉末装入玻璃瓶中,加适量蒸馏水,摇匀,封盖,4℃冰箱保存。

1.3 试剂

2,4,6-三硝基苯磺酸(DNBS)(美国Sigma公司,批号:STBH2928);Claudin-1抗体(美国ImmunoWay公司,批号:YT0942);ZO-1抗体(英国Abcam公司,批号:ab96587);β-actin抗体(美国ImmunoWay公司,批号:B2801);鼠COX-2 ELISA KIT、鼠iNOS ELISA KIT试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:05/2020)。

1.4 仪器

实时荧光定量PCR仪(FTC-3000P,加拿大枫岭公司);Power Pac™ Basic垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司);Vari Mix蛋白震荡摇床(美国Thermo公司);化学发光成像系统(ChemiDoc-IT610,美国UVP公司);大鼠束缚器(HL-DTS,北京合力科创公司);离心机(BiofugeprimoR,德国Heraeus)。

2 方法

2.1 动物分组

将120只Wistar大鼠在SPF级实验室适应性喂养7d后,随机分为空白组、模型组、美沙拉嗪组和痛泻要方高、中、低剂量组,每组20只。

2.2 造模方法

参照课题组前期造模方法^[3],采取DNBS/乙醇溶液灌肠法+束缚应激法+饮食失节法建立动物实验模型。具体内容如下:120只大鼠自由摄食饮水1周后,除空白组除外,其余各组大鼠每日束缚四肢约6h,隔日进食。束缚1周结束,断食24h,用3%戊巴比妥(30mg/kg)腹腔注射麻醉,把聚丙烯管侧面剪出若干小孔,由肛门处插进结肠内部约8cm,将DNBS(25mg/只)+50%的乙醇0.25mL溶液混匀,用注射器通过聚丙烯管向肠腔内注入混合液后,再立即推入0.4mL空气,固定大鼠头部,捏紧肛门,呈倒立状态约1min,待清醒后正常喂养。灌肠法造模后,于第2天开始,仍每日束缚大鼠四肢约6h,持续2周,隔日进食。

2.3 动物模型的评价标准

①体质量测定。②心理行为改变。③肠道动力改变。④大鼠一般状态。⑤结肠组织大体形态及光镜观察,并评分;HE染色,光镜下观察肠黏膜各层炎性细胞浸润、镜下溃疡分布情况。综合①+②+③+④+⑤五项判断模型是否成功^[4]。

2.4 给药方法及标本采集

模型制备后,空白组、模型组均灌服10mL/kg蒸馏水;美沙拉嗪组按0.4g/kg剂量灌胃(10mL/kg);按体表面积折算法计算,痛泻要方高、中、低剂量组按生药20.8、10.4、5.2g/kg(该剂量约为60kg成人日摄入剂量的10、5、2.5倍)灌胃(10mL/kg),各组于造模后第2天开始灌胃,1次/d,连续21d。

标本采集:采用3%戊巴比妥(30mg/kg)腹腔麻醉,腹主动脉取血,分离血清,-80℃冰箱保存。采用颈椎脱臼法处死大鼠后,截取大鼠结肠约肛门上8cm,将结肠组织样本截成两个部分,一部分固定在4%多聚甲醛溶液中,另一部分直接置于经DEPC水处理后的1.5mL离心管中,备用。

2.5 指标检测及方法

2.5.1 观察指标

观察大鼠每日精神、饮食、大便性状等情况,定期称重,并记录。观察结肠黏膜组织糜烂、充血、水肿、溃疡等情况,判断黏膜损伤程度。

2.5.2 HE 染色观察结肠组织病理变化

将固定于 4% 多聚甲醛溶液中的结肠组织取出,切取 0.5 cm 大小的组织块,用 PBS(phosphate buffered saline)缓冲液冲洗,脱水透明,包埋切片,脱蜡水化,苏木素染色,伊红染色,脱水透明,显微镜下拍照,观察分析。

2.5.3 ELISA 检测

按照相应指标 ELISA 试剂盒说明书进行。具体步骤如下:将 4℃ 保存的 ELISA 试剂盒置于室温平衡 30 min。布板,标准品加样,样品加样,加酶,封板,温育,配液,洗涤,每孔各加入显色剂 A 和 B 50 μL,终止反应。终止液加入 15 min 内于 450 nm 波长处测量各孔 OD 值,依据所测标准品 OD 值制作标准曲线,然后根据标准曲线及各组样品 OD 值计算各样品浓度。

2.5.4 RT-PCR 检测

取 50 mg 组织,加入 300 μL 的裂解 Buffer RL,使用离心柱法提取总 RNA,使用微量分光光度计测量 OD 值,计算 RNA 的纯度及浓度。去除基因组 DNA 反应,放入 PCR 仪进行预变性,参数设置为 42℃,2 min;4℃,0 min。反转录反应:参数设置为 37℃,15 min;85℃,5 s;4℃,0 s。荧光定量:建立 20 μL 反应体系,放入荧光定量 PCR 仪,按照两步法 PCR 扩增标准程序进行反应。参数设置为①预变性 Number of Cycles:1,95℃,30 s;② PCR 反应 Number of Cycles:40,95℃,3 s,60℃,30 s Melt Curve Stage。反应结束后,观察扩增→曲线、溶解曲线及 CT 值,以 2^{-ΔΔCt} 数据分析法对各基因 mRNA 的表达进行相对定量计算。各引物由日本 TaKaRa 公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 各基因 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
Claudin-1	上游:CATGAAGTGCATGAGGTGCTTAGAA	107
	下游:TGGCCACTAATGTCGCCAGA	
ZO-1	上游:CCATCTTTGGACCGATTGCTG	123
	下游:TAATGCCCGAGCTCCGATG	
β-actin	上游:CCTAAGGCCAACCGTGAAAA	103
	下游:CAGAGGCATACAGGGACAACAC	

2.5.5 免疫组化检测

将固定于 4% 多聚甲醛溶液中的结肠组织取出,石蜡包埋、切片后,依次进行脱蜡水化→抗原热修复→

封闭过氧化氢酶→正常血清封闭→滴加抗体工作液→复染→脱水、透明→观察分析阳性表达的平均光密度值(MOD)。

2.5.6 Western blot 检测

组织蛋白提取全程冰上操作。取 0.1 g 冻存的结肠组织,用预冷的生理盐水冲洗数次,将组织放入 EP 管中加入预冷的生理盐水并用眼科剪剪碎,4℃,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清,重复操作,至液体清澈。加入 RIPA 蛋白裂解液(RIPA Lysis Buffer)(每 20 mg 组织加 150~250 μL 裂解液)和苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)(RIPA:PMSF=100:1),混匀备用。用研磨器将组织磨碎,在冰上裂解 30 min,每 10 min 剧烈振荡 1 次。最后 4℃,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。使用 BCA 蛋白定量试剂盒,对蛋白提取液进行定量分析。蛋白变性,根据待测蛋白分子量的大小配胶,上样电泳,转膜封闭,用封闭液稀释对应一抗(Claudin-1 为 1:1 000;ZO-1 为 1:2 000;β-actin 为 1:5 000),将 PVDF 膜浸泡于一抗中,室温下摇匀 2 h 后,4℃过夜。洗涤 3 次,加入二抗(1:8 000)孵育 2 h,按 1:1 配置发光液,将条带平铺于玻璃板上,滴加 ECL 超敏发光液,用化学发光成像系统曝光,读取条带的灰度值,以 β-actin 为参考,计算目的蛋白的相对表达量,显影后用 Quantity one 图像分析软件进行扫描分析,并使用 Image J 软件进行数据分析。

2.6 统计学方法

运用 SPSS24.0 软件分析,计量资料且符合正态分布用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 One-Way,ANOVA 分析。以 α=0.05 为检验水准,P<0.05 代表差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般状况的比较

空白组大鼠精神状态良好,进食饮水量正常。与空白组比较,模型组大鼠反应迟钝,精神差,活动度低,喜扎堆,进食、饮水量均减少,形体消瘦,体质量减轻,大便稀溏。药物干预结束后,与模型组比较,美沙拉嗪组及痛泻要方高、中剂量组大鼠精神状态均有不同程度的改善,进食饮水量正常,大便无黏液脓血便,大部分成形,体质量逐渐增加;痛泻要方低剂量组一般状态及症状稍有改善。

3.2 各组大鼠结肠组织病理变化的比较

空白组大鼠结肠组织,杯状细胞排列整齐,形态结构正常。与空白组比较,模型组大鼠结肠组织有炎性细胞浸润,肠隐窝脓肿、坏死,黏膜层有糜烂现象。与模型组比较,美沙拉嗪组及痛泻要方高剂量组结肠组

组织中细胞排列结构较整齐,炎性细胞减少,黏膜结构均较清晰。痛泻要方中剂量组结肠组织有轻度水肿,未见明显的溃疡现象。痛泻要方低剂量组结肠组织中有

少量炎性细胞浸润。各治疗组黏膜层溃疡面均有不同程度好转,以痛泻要方高剂量组和美沙拉嗪组治疗效果最好。见图1。

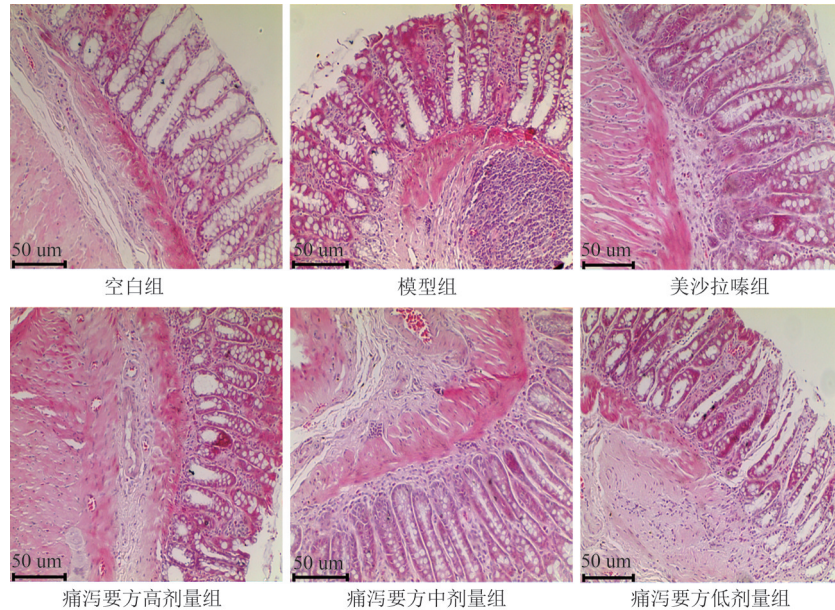


图1 各组大鼠结肠组织病理变化情况(HE,×200)

3.3 各组大鼠血清中COX-2、iNOS含量的比较

与空白组比较,模型组COX-2、iNOS含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组COX-2、

iNOS含量明显降低($P < 0.01$),痛泻要方高、中剂量组COX-2、iNOS含量明显降低($P < 0.01$),痛泻要方低剂量组COX-2、iNOS含量降低($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠血清中COX-2、iNOS含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(g/kg)	COX-2	iNOS
空白组	12	—	16.938 ± 0.924	12.867 ± 0.864
模型组	12	—	24.408 ± 1.197 ^{##}	25.827 ± 3.247 ^{##}
美沙拉嗪组	12	0.4	18.216 ± 0.877 ^{**}	16.878 ± 1.409 ^{**}
痛泻要方高剂量组	12	20.8	17.851 ± 1.201 ^{**}	14.260 ± 1.154 ^{**}
痛泻要方中剂量组	12	10.4	19.160 ± 1.109 ^{**}	18.383 ± 2.049 ^{**}
痛泻要方低剂量组	12	5.2	21.504 ± 1.155 [*]	21.755 ± 2.484 [*]

注:与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

3.4 各组大鼠结肠组织中Claudin-1、ZO-1 mRNA表达的比较

与空白组比较,模型组Claudin-1、ZO-1 mRNA的表达量明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,美沙拉

嗪组及痛泻要方高、中剂量组Claudin-1、ZO-1 mRNA的表达量显著升高($P < 0.01$);痛泻要方低剂量组Claudin-1、ZO-1 mRNA的表达量与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠结肠组织中Claudin-1、ZO-1 mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(g/kg)	Claudin-1	ZO-1
空白组	3	—	1.003 ± 0.099	1.001 ± 0.059
模型组	3	—	0.350 ± 0.040 ^{##}	0.241 ± 0.012 ^{##}
美沙拉嗪组	3	0.4	0.850 ± 0.028 ^{**}	0.644 ± 0.033 ^{**}
痛泻要方高剂量组	3	20.8	0.729 ± 0.013 ^{**}	0.540 ± 0.017 ^{**}
痛泻要方中剂量组	3	10.4	0.617 ± 0.044 ^{**}	0.457 ± 0.036 ^{**}
痛泻要方低剂量组	3	5.2	0.459 ± 0.042 [▽]	0.263 ± 0.025 [▽]

注:与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$, [▽] $P > 0.05$ 。

3.5 各组大鼠结肠组织中 Claudin-1、ZO-1 平均光密度值表达的比较

与空白组比较,模型组 Claudin-1、ZO-1 平均光密度值表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组、痛泻要方高、中剂量组 Claudin-1、ZO-1 平均光密度值表达显著升高($P < 0.01$);痛泻要方低剂量组 Claudin-1、ZO-1 平均光密度值表达升高($P < 0.05$)。见表4、图2和图3。

3.6 各组大鼠结肠组织中 Claudin-1、ZO-1 蛋白表达量的比较

与空白组比较,模型组 Claudin-1、ZO-1 蛋白相对表达量显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组及痛泻要方高、中剂量组 Claudin-1、ZO-1 蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$);痛泻要方低剂量组 Claudin-1、ZO-1 蛋白相对表达量升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见表5和图4。

表4 各组大鼠结肠组织中 Claudin-1、ZO-1 平均光密度值表达比较($\bar{x} \pm s$, MOD)

组别	<i>n</i>	剂量/(g/kg)	Claudin-1	ZO-1
空白组	3	—	1.000 ± 0.135	1.000 ± 0.135
模型组	3	—	0.061 ± 0.010 ^{##}	0.171 ± 0.015 ^{##}
美沙拉嗪组	3	0.4	0.559 ± 0.142 ^{**}	0.823 ± 0.047 ^{**}
痛泻要方高剂量组	3	20.8	0.782 ± 0.097 ^{**}	0.680 ± 0.135 ^{**}
痛泻要方中剂量组	3	10.4	0.317 ± 0.057 ^{**}	0.372 ± 0.032 ^{**}
痛泻要方低剂量组	3	5.2	0.132 ± 0.024 [*]	0.329 ± 0.036 [*]

注:与空白组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。

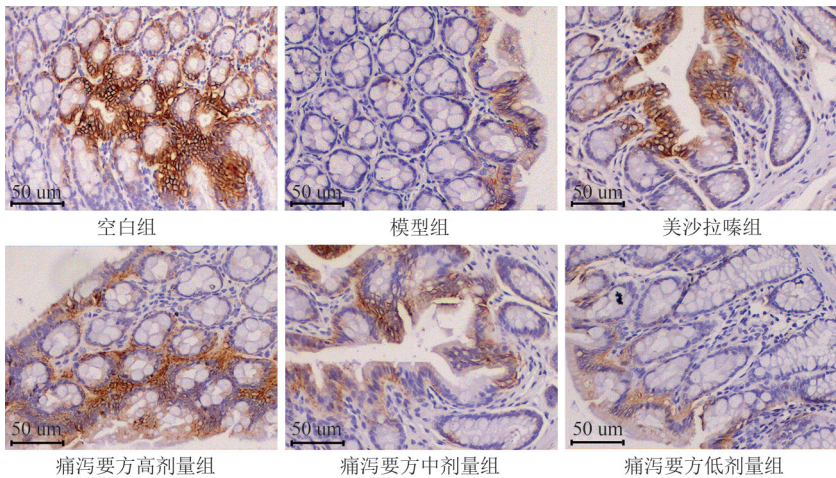


图2 各组大鼠结肠组织中 Claudin-1 免疫组化图(× 200)

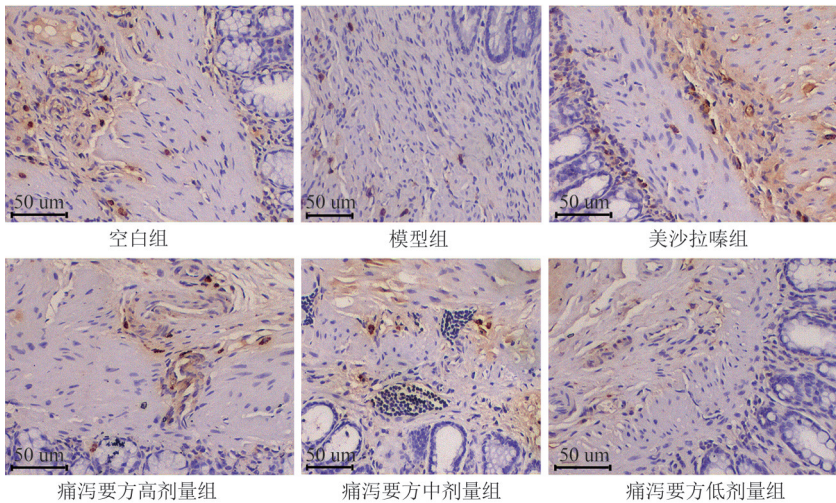
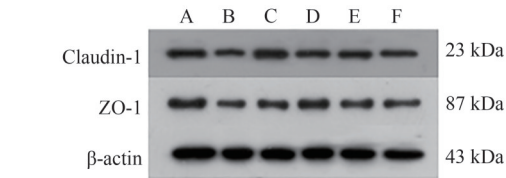


图3 各组大鼠结肠组织中 ZO-1 免疫组化图(× 200)

表5 各组大鼠结肠组织中 Claudin-1、ZO-1 蛋白表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	Claudin-1	ZO-1
空白组	3	—	0.92 ± 0.06	0.94 ± 0.03
模型组	3	—	0.36 ± 0.06 ^{##}	0.61 ± 0.03 ^{##}
美沙拉嗪组	3	0.4	0.89 ± 0.04 ^{**}	0.92 ± 0.04 ^{**}
痛泻要方高剂量组	3	20.8	0.78 ± 0.06 ^{**}	0.82 ± 0.03 ^{**}
痛泻要方中剂量组	3	10.4	0.76 ± 0.06 ^{**}	0.73 ± 0.03 ^{**}
痛泻要方低剂量组	3	5.2	0.64 ± 0.03 ^{**}	0.55 ± 0.02 [*]

注:与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。



注:A为空白组;B为模型组;C为美沙拉嗪组;D为痛泻要方高剂量组;E为痛泻要方中剂量组;F为痛泻要方低剂量组。

图4 各组大鼠结肠组织中 Claudin-1、ZO-1 免疫印迹图

4 讨论

中医学认为,肝郁脾虚型 UC 的病机为恼怒、抑郁、精神紧张等情志不遂因素,导致肝失疏泄、横逆侮脾、气血凝滞,则见腹痛、肠络失和,日久血败肉腐、溃疡形成。痛泻要方是治疗肝郁脾虚型溃疡性结肠炎的代表方,现代药理学研究发现,痛泻要方中白术能改善消化系统功能、调节胃肠道运动^[5-7];白芍能降低大鼠血清中炎症细胞因子含量,调节肠黏膜免疫紊乱,修复肠道局部炎症^[8];防风对 PI-IBS 模型大鼠不仅具有止痛、止泻的作用,而且可以扶植益生菌,抑制条件致病菌^[9];陈皮中所含挥发油可刺激胃肠道平滑肌,有利于促进消化液分泌^[10]。本实验通过探讨痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 大鼠结肠组织 Claudin-1、ZO-1 蛋白和 mRNA 以及细胞因子 COX-2、iNOS 表达的影响,进而阐明痛泻要方干预 UC 的作用机制。

内质网作为细胞内最大的膜网络结构,当肠黏膜上皮细胞内质网受到体内、外因素破坏时,出现大量未折叠蛋白或错误折叠蛋白发生 ERS,ERS 是由于错误折叠蛋白或未折叠蛋白过多聚集而被激活的,过度 ERS 可能导致肠黏膜屏障功能受损,继而参与 UC 发病^[11-12]。细胞间紧密连接是机械屏障最重要的组成部分且直接反映其功能,研究发现紧密连接是由多种蛋白所构成,其中以 Claudin-1、ZO-1 等最具代表性,这些蛋白对于维持紧密连接的结构功能及肠道通透性起着决定性作用^[13]。正常情况下,肠黏膜通过 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白紧密链接来维持肠道屏障功能和完整性,过度 ERS 时,肠黏膜 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白异常表达,肠黏膜损害,上皮细胞发生 ERS,肠屏障功能紊乱。ERS 途径不仅可以影响肠道上皮的抗微

生物能力,而且还能影响 IEC 对共生菌群和炎症介质的敏感性。所以 IEC 能自主调节其对共生菌群和炎症环境的反应性,但当反应达到一定程度时就会引起肠道炎症^[14]。

相关实验研究表明^[15-17],触发 UC 的关键与炎症因子关系密切,通过调控炎症因子的含量,可以起到修复肠黏膜屏障损伤的作用。COX-2 在机体炎症反应调节过程中具有重要的调节作用,其主要以环氧合酶家族中诱导型酶的形式存在,在细胞内外刺激作用下被激活,进而发挥病理和生理作用。COX-2 的表达量降低可以减轻肠黏膜的损伤情况^[18-19]。iNOS 合成的 NO 水平升高已成为 UC 的主要生物标志物之一,抑制 iNOS 表达成为众多 UC 药物治疗的重要靶点^[20]。研究表明,UC 患者 NO 含量明显升高,且与 UC 的严重程度密切相关。临床研究发现,iNOS 在炎症期间可诱导 COX-2 表达,而 COX-2 反过来促进 iNOS 表达,iNOS 和 COX-2 被认为是结肠炎病变过程中的两种关键酶^[21],二者在肠黏膜稳态环境中均发挥着重要作用。

本实验结果表明,模型组大鼠血清中 COX-2、iNOS 含量显著升高;结肠黏膜组织中 Claudin-1、ZO-1 蛋白及 mRNA 的表达量明显降低。而痛泻要方高、中剂量组及美沙拉嗪组大鼠血清中 COX-2、iNOS 含量显著降低;在结肠组织中,痛泻要方高、中剂量组及美沙拉嗪组 Claudin-1、ZO-1 蛋白及 mRNA 的表达量均显著升高,以痛泻要方高剂量组及美沙拉嗪组更为显著,且痛泻要方高剂量组和美沙拉嗪组疗效相当。

综上所述,痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 大鼠肠黏膜屏障损伤具有明显的修复作用,其作用机制可能与上调 Claudin-1、ZO-1 蛋白及基因的表达、抑制炎症细胞因子 COX-2、iNOS 的含量有关。

【参考文献】

[1] DAREN L, DEANNA D N, EMIKO M. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2013, 11(7): 1341-1357.
[2] PAGANO E, ROMANO B, IANNOTTI F A, et al. The non-euphoric phytocannabinoid cannabidivarin counteracts intestinal inflammation in mice and cytokine expression in biopsies from UC pediatric patients[J]. Pharmacological research, 2019, 149: 104464.

- [3] 刘苗,申睿,朱向东,等. 痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎模型大鼠 TNF- α 、Casepase3、Chop 的影响[J]. 中医学报, 2019, 34(7): 1436-1441.
- [4] 郭建丽,冯玛莉,宋美卿,等. 情志刺激致大鼠肝郁脾虚证模型的研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2976-2978.
- [5] DEURING J J, D E H C, KOELEWIJN C L, et al. Absence of ABCG2-mediated mucosal detoxification in Patients with active inflammatory bowel disease is due to impeded protein folding [J]. Biochem J, 2012, 441(1): 87-93.
- [6] 吴鹏,李慧芬,刘江亭,等. 白术及其制剂调整脾虚证肠道菌群紊乱的研究概况[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(7): 564-565.
- [7] 王彪猛,刘德科,陈嘉屿. 白术治疗胃肠道疾病作用机制的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(17): 2436-2438.
- [8] 吴慧丽,李慧. 白芍总苷对溃疡性结肠炎大鼠细胞因子影响的研究[J]. 中南药学, 2010, 8(2): 128-131.
- [9] 齐绍云,蔡洁毅,周龙艳,等. 防风对 PI-IBS 模型大鼠肠道菌群及丝氨酸蛋白酶信号的影响[J]. 中国新药与临床药理, 2015, 26(6): 790-796.
- [10] 李卫霞. 陈皮的药理分析及临床应用研究[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(10): 1521-1522.
- [11] HOSOMI S, KASER A, BLUMBERG R S. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2015, 31: 81-88.
- [12] KOH S J, KIM J W, KIM B G, et al. Fexofenadine regulates nuclear factor- κ B signaling and endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells and ameliorates acute and chronic colitis in mice [J]. Pharmacol Exp Ther, 2015, 352: 455-461.
- [13] MAHARSHAK N, PACKEY C D, ELLERMANN M, et al. Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation [J]. Gut Microbes, 2013, 4(4): 316-324.
- [14] NEQRONI A, PRETE E, VITALI R, et al. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response are involved in paediatric inflammatory bowel disease [J]. Dig Liver Dis, 2014, 46(9): 788-794.
- [15] 王继森,苟缙,杨丁雨,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠的保护作用及其影响 NF- κ B p65 蛋白和相关炎症因子表达的机制研究[J]. 中药与临床, 2021, 12(2): 21-25.
- [16] 郝彦伟,张怡,周雪雷,等. 基于 mTOR/p-S6K1 探讨加味附子理中汤干预 UC 大鼠肠黏膜炎症反应的效应机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 59-65.
- [17] 张颖慧,董向前,白丽萍,等. Toll 样受体、前列腺素受体 EP2 在溃疡性结肠炎组织的表达与炎症细胞因子的关系[J]. 四川医学, 2019, 40(4): 390-394.
- [18] SAW T Y, MALIK N A, LIM K P, et al. Oral supplementation of tocotrienol-rich fraction alleviates severity of ulcerative colitis in mice [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2019, 65(4): 318-327.
- [19] 丁凌辉,贾育新,成映霞,等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎脾虚湿困证大鼠结肠 IL-13, IL-23 及 COX-2, CREB 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 67-72.
- [20] KAMALIAN A, SOHRABI A M, DOLATSHI M, et al. Interventions of natural and synthetic agents in inflammatory bowel disease, modulation of nitric oxide pathways [J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(24): 3365-3400.
- [21] 朱凤,范恒. 复方苦参汤对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1): 416-419.

(收稿日期: 2022-09-27)

Effect of Tongxie Yaofang on Claudin-1 and ZO-1 in Colon Tissues and COX-2 and iNOS in Serum of IC Rats with Liver Depression and Spleen Deficiency

FAN Lihui¹, ZHU Xiangdong², YANG Xia¹, WANG Zhigang³✉

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, China; 3. Tianshui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianshui 741000, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of Tongxie Yaofang on the contents of cyclooxygenase-2 (COX-2) and induced nitric oxide synthase (iNOS) in serum and gene and protein expressions of Claudin-1 and zonula occludens-1 (ZO-1) in colon tissues of rats with ulcerative colitis (UC) of Liver depression and Spleen deficiency type. Methods: 100 Wistar rats were used to reconstruct the UC model of Liver depression and Spleen deficiency by disease-syndrome combination method. The successful modeling rats were randomly divided into the model group (10 g/kg distilled water), the Mesalazine group (0.4 g/kg Mesalazine), and the Tongxie Yaofang groups of high-dose, medium-dose and low-dose (20.8 g/kg, 10.4 g/kg, 5.2 g/kg), with 20 rats in each group. Another 20 normal rats were taken as the blank control (10 g/kg distilled water). The gavage volume of each group was 10 ml/kg. After 21 days of corresponding intervention, the serum contents of COX-2 and iNOS were detected by ELISA; the general morphology and injury of colon tissues were observed, and HE staining was used to observe the pathological manifestations. RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of Claudin-1 and ZO-1. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the average optical density and the protein expressions of Claudin-1 and ZO-1. Results: Light microscopic observation showed that the colonic mucosa was in congested

and edema state, there was inflammatory cell infiltration, and the tight junction between cells was broken in the model group. After the intervention of Tongxie Yaofang, the pathological changes of rat colonic mucosa were significantly improved and the tight junction between cells was normal. Compared with those in the blank group, the serum contents of COX-2 and iNOS increased significantly ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expressions of Claudin-1 and ZO-1, as well as the average optical density decreased significantly in the model group ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the contents of COX-2 and iNOS decreased in the Mesalazine group ($P < 0.01$); the contents of COX-2 and iNOS significantly decreased in the Tongxie Yaofang groups of high-dose and medium-dose ($P < 0.01$), and the contents of COX-2 and iNOS decreased in the low-dose group as well ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the mRNA expressions of Claudin-1 and ZO-1, as well as the average optical density increased significantly in the Mesalazine group and the Tongxie Yaofang groups of high-dose and medium-dose ($P < 0.01$); there were no statistical differences in the mRNA expressions of Claudin-1 and ZO-1 between the model group and the Tongxie Yaofang group of low-dose ($P > 0.05$); the average optical density increased in the Tongxie Yaofang group of low-dose ($P < 0.05$). The protein expressions of Claudin-1 and ZO-1 increased significantly in the Mesalazine group and the Tongxie Yaofang groups of high-dose and medium-dose ($P < 0.01$), and the protein expressions of Claudin-1 and ZO-1 increased in the Tongxie Yaofang group of low-dose ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion: The mechanism of Tongxie Yaofang in treating UC of Liver depression and Spleen deficiency may be related to up-regulating the expression of key proteins of Claudin-1 and ZO-1 and reducing the contents of inflammatory cytokines of COX-2 and iNOS.

【Key words】 Tongxie Yaofang; Ulcerative colitis; Claudin-1; ZO-1; COX-2; iNOS

(上接第14页)

Action Mechanism of Yuzhi Zhixue Granule in Treating Rats with AUB Based on Proteomics Technology

ZHANG Xiaochuan, LOU Suhui, NIE Anzheng, LI Xiaoping✉

(The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Objective: To study the effect of Yuzhi Zhixue Granule (YZZXG) on protein expressions in rats with abnormal uterine bleeding (AUB), and to explore its mechanism in treating AUB. Methods: 30 SPF Wistar female pregnant rats were randomly divided into the control group, the model group and the medication group, with 10 rats in each group. The model drug-induced abortion in early pregnancy were established in the rats of the model group and the medication group. The medication group was administrated with YZZXG for 7 days, the amount of bleeding in each group was measured on day 1, day 2, day 3 and day 7. Quantitative proteomics was used to analyze the effect of YZZXG on the differential expression of serum proteins in the rats and to analyze the signaling pathway of differential proteins. And the differential proteins and signaling pathways were verified by parallel reaction monitoring. Results: The amount of uterine bleeding was significantly increased in the model group from day 1 ($P < 0.01$); compared with that in the model group, the amount of uterine bleeding was significantly reduced in the medication group from day 1 ($P < 0.01$). The results showed that 5,496 proteins were obtained by total quantitation. There were 84 differential proteins between the medication group and the model group; among them, 28 were up-regulated and 56 were down-regulated. Differential proteins were mainly enriched in PI3K/Akt signaling pathway, complement and coagulation cascade, platelet activation and other signaling pathways. Vitronectin, plasminogen and serine protease inhibitor D1 heparin cofactor II were selected for PRM verification, and the verification results were consistent with the TMT results. Conclusion: YZZXG can regulate the protein expressions of hyalenin and plasminogen to achieve the therapeutic effect in treatment of AUB in rats.

【Key words】 Yuzhi Zhixue Granule; Proteomics; Abnormal uterine bleeding; Parallel reaction monitoring