

本文引用: 陈 镇, 向 彪, 周 鑫, 付子煜, 刘 涛, 吴金鸿, 欧阳林旗, 喻 斌, 邓桂明. 不同产地乌药质量评价及其改善 IBS-D 大鼠肠道低度炎症的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(11): 1963-1970.

不同产地乌药质量评价及其改善 IBS-D 大鼠 肠道低度炎症的机制研究

陈 镇, 向 彪, 周 鑫, 付子煜, 刘 涛, 吴金鸿, 欧阳林旗, 喻 斌, 邓桂明*

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 基于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对 10 批次不同产地乌药进行质量评价, 并进一步探究乌药对腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)大鼠肠道低度炎症的作用机制。**方法** 采用 HPLC 对 10 个不同批次乌药进行质量评价。选取雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为对照组、IBS-D 模型组、乌药低剂量组、乌药中剂量组、乌药高剂量组、阳性药物组。除对照组外, 其余大鼠均接受“番泻叶灌胃联合束缚应激”刺激, 构建 IBS-D 大鼠模型。乌药低、中、高剂量组大鼠分别灌胃乌药水提物(0.94、1.88、3.76 g·kg⁻¹), 阳性药物组大鼠予以匹维溴铵片水溶液(1.5 g·kg⁻¹); 而对照组和 IBS-D 模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水, 共计 2 周; 采用 HE 染色、PAS 染色观察大鼠结肠变化; 运用免疫组织化学法和 Western blot 技术检测大鼠结肠组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecular-1, VCAM-1)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶(proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC)、Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)蛋白的相对表达水平。**结果** 相似度评价、聚类结果和主成分分析结果显示, 除浙江乌药(S6)外, 其余批次乌药质量从整体上而言稳定可靠。HE 染色和 PAS 染色结果显示, 与对照组相比, IBS-D 模型组大鼠结肠隐窝深度明显变浅、隐窝处杯状细胞数量明显减少; 与 IBS-D 模型组相比, 中、高剂量的乌药水提物能明显改善 IBS-D 大鼠结肠组织隐窝深度变浅及杯状细胞减少的状态; 免疫组织化学和 Western blot 结果显示, 3 个剂量组的乌药水提物均可显著增强 IBS-D 大鼠结肠中 PPAR- γ 、YAP 和 SRC 蛋白的相对表达量($P<0.05$), 同时能显著降低 VCAM-1 蛋白的相对表达量($P<0.05$)。**结论** 不同批次的乌药化学成分和含量差异不大, 乌药能显著改善 IBS-D 大鼠低度炎症, 其作用机制可能与调控 PPAR- γ /VCAM-1 有关。

[关键词] 乌药; 腹泻型肠易激综合征; 质量评价; 低度炎症; PPAR- γ /VCAM-1 信号通路; 作用机制

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.005

Quality evaluation of Wuyao from different origins and its mechanism in alleviating intestinal low-grade inflammation in IBS-D rats

CHEN Zhen, XIANG Biao, ZHOU Xin, FU Ziyu, LIU Tao, WU Jinhong, OUYANG Linqi,
YU Bin, DENG Guiming*

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the quality of 10 batches of Wuyao (Linderae Radix) from different origins based on high performance liquid chromatography (HPLC), and to further explore its mechanism of action on intestinal low-grade inflammation

[收稿日期] 2023-09-04

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82374424); 湖南省自然科学基金项目(2018JJ6040, 2020JJ5434, 2022JJ70028); 湖南省中医药科研计划项目(2021016); 湖南省教育厅科学研究项目(19A372); 湖南中医药大学科研基金项目(2022YYZK002, 2019XJJ025); 湖南中医药大学中药学重点学科。

[第一作者] 陈 镇, 男, 硕士, 副主任药师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药药效物质基础研究。

[通信作者] * 邓桂明, 女, 博士, 研究员, 博士研究生导师, E-mail: dengguiming@hnuucm.edu.cn。

in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D). **Methods** The quality of 10 different batches of Wuyao (*Linderae Radix*) was evaluated by HPLC. Sixty male SD rats were selected and assigned randomly into control group, IBS-D model group, low-, medium-, and high-dose Wuyao (*Linderae Radix*) groups, and positive drug group. Except the control group, all the other rats were stimulated by "Fanxieye (*Sennae Folium*) gavage combined with restraint stress" to construct IBS-D rat model. The low-, medium-, and high-dose Wuyao (*Linderae Radix*) groups were given intragastric administration of Wuyao (*Linderae Radix*) water extract (0.94, 1.88, 3.76 g·kg⁻¹), and the positive drug group was given aqueous solution of pinaverium bromide tablets (1.5 g·kg⁻¹). The control group and IBS-D model group were treated with equal volume of distilled water by gavage for 2 weeks. HE and PAS staining were used to observe the colonic changes respectively. The relative expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC), and Yes-associated protein (YAP) in rat colon tissues were determined by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Similarity evaluation, clustering results, and principal component analysis showed that the quality of other batches was stable and reliable overall except Zhejiang Wuyao (*Linderae Radix*) (S6). HE staining and PAS staining showed that compared with the control group, the depth of colonic crypts in the IBS-D model group was significantly shallower and there was a noticeable decrease in the number of goblet cells in the crypts. Compared with IBS-D model group, the medium and high doses of Wuyao (*Linderae Radix*) water extract demonstrated significant improvement in the depth of crypt of colon tissues in IBS-D rats and the reduction of goblet cells. Immunohistochemistry and Western blot showed that Wuyao (*Linderae Radix*) water extract of the three dose groups could significantly enhance the relative expressions of PPAR- γ , YAP, and SRC in the colon of IBS-D rats ($P < 0.05$), and also significantly decreased the relative expression of VCAM-1 protein ($P < 0.05$). **Conclusion** There was little difference in chemical composition and content for different batches of Wuyao (*Linderae Radix*). It can notably alleviate low-grade inflammation in IBS-D rats, and its mechanism of action may be related to the regulation of PPAR- γ /VCAM-1 signaling pathways.

[**Keywords**] Wuyao (*Linderae Radix*); diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; quality evaluation; low-grade inflammation; peroxisome proliferator-activated receptor γ /Vascular cell adhesion molecule-1 signaling pathway; mechanism of action

乌药为樟科山胡椒属植物乌药 [*Lindera aggregata* (Sims) Kosterm.] 的干燥块根, 主产于浙江、湖南、广东等地, 具有温肾散寒、行气止痛的功效。乌药主要化学成分为挥发油、生物碱、黄酮类、呋喃倍半萜及其内酯、鞣质等^[1]。现代药理学研究表明, 乌药具有抗炎镇痛、抗肿瘤、保肝、降脂、降糖等药理活性, 其对胃肠道疾病、心血管疾病、代谢综合征、脂肪肝等疾病具有显著的防治作用^[1-4]。课题组前期对乌药药理、药效作用进行了研究^[4-6], 发现乌药水提物对腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 大鼠腹痛、腹泻等症状具有显著改善作用。前期研究证实, 乌药防治 IBS-D 大鼠疗效确切, 但其作用机制仍有待进一步深入研究。

IBS-D 是一种非器质性病变的功能性胃肠道疾病, 以持续或间歇性腹痛或腹部不适、排便频率、粪便性状改变等为主要特征^[7]。IBS-D 发病机制尚未完全阐明, 研究表明其与内脏高敏感性、胃肠动力异常、肠道菌群失调、免疫功能异常、肠道低度炎症等有关^[8-9]。为进一步开发乌药临床药用价值, 本研究通过 HPLC 方法对 10 批不同产地乌药的质量进行分析和评价; 同时, 通过构建 IBS-D 大鼠模型, 进一

步研究乌药对 IBS-D 大鼠低度炎症的作用机制, 期为阐明乌药防治 IBS-D 的作用机制研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 体质量 (200±20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物合格证号 43004700022217, 许可证号 SCXK(湘)2017-0003。饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心, 室温 (23±2) °C, 相对湿度 60%~70%, 昼夜交替 12 h/12 h。大鼠适应性饲养一周后进行实验, 动物实验经湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心伦理委员会批准 (伦理编号: ZYFY20170618-11)。

1.2 药材与试剂

番泻叶 (批号 2015112712) 购自湖南三湘中药饮片有限公司; 10 批次乌药购于湖南中医药大学第一附属医院和广州大参林药店, 其来源信息分别为 S1: 批号 20140227, 郴州; S2: 批号 20160531, 河北; S3: 批号 20150321, 宁乡; S4: 批号 SL15090807, 浙江; S5: 批号 20151028, 湖南; S6: 批号 160406, 浙江;

S7:批号 AM15032602,浙江;S8:批号 HD16052602,湖南;S9:批号 20150824,湖南;S10:批号 160501,广州。上述中药材经湖南中医药大学第一附属医院张裕民教授分别鉴定为樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm 的干燥块根和豆科植物番泻叶 *Cassia angustifolia* Vahl 的干燥小叶,均符合《中华人民共和国药典》记载标准。匹维溴铵片(批号 639288,50 mg/片)购自 Abbott Products SAS 公司。色谱级乙腈(批号:14094423,美国 Merck 公司);色谱级醋酸铵(批号:14091246,上海麦克林公司); β -actin 抗体(批号:AP0060)、YAP 抗体(批号: BZ00449)均购自美国 Bioworld 公司;PPAR- γ 抗体(批号:sc-7273)、VCAM-1 抗体(批号:sc-6285)均购自美国 SANTA CRUZ 公司;SRC 抗体(批号:11097-1-AP,美国 Proteintech 公司);超纯水由 FLB00003057 超纯水制备系统制得。

1.3 仪器

Agilent1290 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);5415R 型冷冻高速离心机(德国艾本德股份公司);KQ5200D 型超声仪(东莞市科桥超声波设备有限公司);BS124S 型十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);RE-5203 型旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂);DR-200Bs 型多功能酶标仪(Diatek 公司);WD-9405A 型脱色摇床(北京市六一仪器厂);A101439 型电泳仪、721BR12725 型凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司;205A 型生物显微镜(中国 Motic 公司);KD-BM II 型生物组织包埋机(浙江省金华科迪仪器设备有限公司);YD-A 型生物组织摊片机(金华市益迪医疗设备有限公司);Milli-Q 型超纯水净化系统(美国 Billerica 公司)。

2 方法

2.1 乌药水提物供试品溶液制备

参考课题组前期文献制备方法^[10],将 10 批不同产地的乌药制备成水提物,分别称取适量乌药,加入 8 倍体积的水,浸泡 30 min,武火加热至沸腾,煎煮 1 h,滤取药物,药渣继续用 6 倍水,武火加热至沸腾,煎煮 1 h,滤取药物,合并续虑物,减压回收浓缩,使每毫升药物相当于 1.0 g 生药,即为乌药水提物供试品溶液。

2.2 番泻叶水浸液制备

参考文献方法^[11],称取适量番泻叶,按照 1:4 的料液比加入沸水将番泻叶浸泡 30 min 后,过滤;然后,再按照上述方法分别再浸泡 3 次,过滤;合并前后 4 次

滤液、混匀;将番泻叶水浸液减压浓缩至 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3 色谱条件

色谱柱:Infinity Lab Poroshell 120 EC-C₁₈ (3.0 mm \times 100 mm,2.7 μm);温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~30 min,2%~9% B;30~70 min,9%~12% B;70~80 min,12%~40% B;80~82 min,40% B;流速 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积 10 μL ;检测波长 280 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度 取样品 S9 的供试品溶液,稀释 50 倍,离心 30 min ($12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$),用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤于离心管中待测,按上述色谱条件重复进样 6 次,计算得各主要峰的相对保留时间 RSD 为 1%以内,峰面积的 RSD 均小于 3.0%,符合指纹图谱的检测要求。

2.4.2 重复性 取样品 S9 6 份,精密称定,按“2.1”方法制得供试品溶液,并稀释 50 倍,精滤后在上述色谱条件下测定,各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 1%以内,峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明该方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性 取样品 S9 1 份,按“2.1”方法制得供试品溶液,并稀释 50 倍,精滤后按上述色谱条件分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样。各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 1%以内,峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明此样品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.5 造模、分组与给药

适应性饲养结束后,按照区组随机分组法将 60 只 SD 大鼠分成对照组 10 只,模型组 50 只。采用“番泻叶灌胃联合束缚应激”的方法制备 IBS-D 大鼠模型^[12]:灌胃 $3.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 番泻叶水浸液,灌药 1 h 后捆绑其前肢 0.5 h,造模持续 2 周。将造模成功的 50 只大鼠随机分为 IBS-D 模型组、乌药低剂量组、乌药中剂量组、乌药高剂量组和阳性药物组,每组各 10 只。乌药低、中、高剂量组大鼠分别给予 0.94 、 1.88 、 $3.76 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 乌药水提物灌胃,阳性药物组给予 $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 匹维溴铵水溶液灌胃,对照组和 IBS-D 模型组大鼠给予等体积蒸馏水灌胃,所有大鼠每日灌胃 1 次,共持续 2 周。

2.6 样本收集与处理

末次给药后,所有大鼠禁食不禁水 24 h,麻醉,腹主动脉采血后处死。收集各组大鼠的结肠组织,生理盐水淋洗干净后,一部分浸泡于 4% 多聚甲醛中备用,另外一部分分装好迅速转移至 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.7 HE染色观察结肠组织形态

取大鼠结肠组织于4%多聚甲醛中固定,切成约0.2 cm厚的组织块,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明。浸蜡:48~52℃软蜡30 min,58~62℃硬蜡60 min;包埋:自然冷却后修整蜡块置低温保存备用;切片:厚度约5 μm,摊片,捞片,60℃烤箱中烘烤;染色。二甲苯中透明5 min,中性树胶封片,常温晾干。

2.8 PAS染色观察结肠组织杯状细胞形态及数量变化

切片、脱蜡后,于N-HCl液内室温浸洗1 min。再转入已预热到60℃的N-HCl液内8 min。水解后在N-HCl液室温浸洗1 min。在临用时新配的亚硫酸溶液内洗3次,每次2 min。流水冲洗5 min,蒸馏水洗。复染于1%光绿水溶液2 min,复染后水洗。脱水,透明,封片。最后,根据Kruschewski法进行组织学指数评分,观察各组大鼠结肠隐窝上的杯状细胞数量的变化。

2.9 免疫组织化学检测YAP、PPAR- γ 、SRC、VCAM-1蛋白表达水平

切片、脱蜡后,3%过氧化氢浸泡10 min,蒸馏水洗,PBS洗2次,每次3 min。抗原修复1次:把切片浸泡在PBS中,微波炉加热沸腾即可。隔水冷却至常温,PBS洗2次,每次3 min。37℃恒温箱中孵育 β -actin抗体2 h,PBS洗3次,每次2 min。使用中杉金桥PV9000二抗试剂盒,滴加试剂1,室温20 min,PBS洗3次,每次2 min;滴加试剂2,室温30 min,PBS洗3次,每次2 min;加DAB显色,显微镜下观察显色结果,自来水终止反应。苏木素复染3 min,水洗,盐酸乙醇分色,自来水中促蓝。脱水、透明,中性树胶封片,常温晾干。

2.10 Western blot检测YAP、SRC蛋白表达水平

适量结肠组织块研碎,加入适量裂解液冰上放置20 min,使用超声破碎仪粉碎20 s,于4℃,15 000 r/min离心10 min,取上清液测量蛋白浓度,酶标仪检测各个样品562 nm波长的吸光度值。分别配制10%分离胶及5%浓缩胶,每孔上样本蛋白40 μg。80 V浓缩胶中电泳30 min,120 V分离胶中电泳约90 min,溴酚兰距玻璃板5 mm左右终止电泳,并以4℃,100 V湿转1.5 h后,将PVDF膜取出置TBST配制的5%脱脂牛奶封闭1 h。PVDF膜和 β -actin抗体(1:5 000)放入抗体孵育盒,4℃过夜。TBST缓冲液洗膜3次,37℃孵育山羊抗兔二抗1 h,TBST缓冲液洗膜3次。凝胶成像软件显影、

定量并计算目标蛋白的相对表达量。

2.11 统计分析

使用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析,数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。若满足正态性检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐用LSD,方差不齐用Dunnett T3分析;若不满足正态性检验,多组间比较采用秩和检验;组间比较采用独立样本t检验; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HPLC结果

按照“2.1”制备S1-S10号供试品溶液,并稀释50倍,精滤后再按上述色谱条件进行检测。将10批乌药样品的HPLC图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版本)”软件,并生成指纹图谱,设置S5为参照图谱,对色谱峰多点校正后进行全谱峰匹配后标定了14个共有峰。

3.2 相似度评价

选择10批乌药样品中色谱峰峰型、分离度良好且基线平整的S5样品色谱图作为参照指纹图谱。对色谱峰多点校正后进行全谱峰匹配,用中位数法生成对照图谱。结果显示,S6的相似度为0.868,而其余9批乌药样品相似度均大于0.950。浙江乌药相似度较其他产地乌药低,表明它们在化学成分组成上存在一定的差异。

3.3 聚类分析和主成分分析

10批乌药的HPLC指纹图谱中共有14个共有峰(见表1、图1),将14个共有峰的相对峰面积数据进行聚类分析和主成分分析(见图2)。结果显示,样品S6偏离原点较远,自成一类;而其余批次,不同产地的乌药聚集成同一类。由此说明,浙江乌药与其余批次乌药在化学成分组成上具有较大的差异,而湖南、河北、广东乌药在化学组成上差异不大。上述分析结果与相似度结果一致,说明乌药饮片质量相对稳定。基于上述实验结果,本文选取产于湖南的乌药(批号20150824)作为被试药材水提取物对IBS-D大鼠进行干预治疗。

3.4 乌药水提取物对IBS-D大鼠结肠组织形态及杯状细胞的影响

HE染色结果显示,与对照组相比,模型组可见炎性细胞浸润,但未见充血、坏死、溃疡等情况。用IPP6.0软件分析结肠隐窝深度,并根据Kruschewski法进行组织学指数评分。与对照组相比,模型组中隐

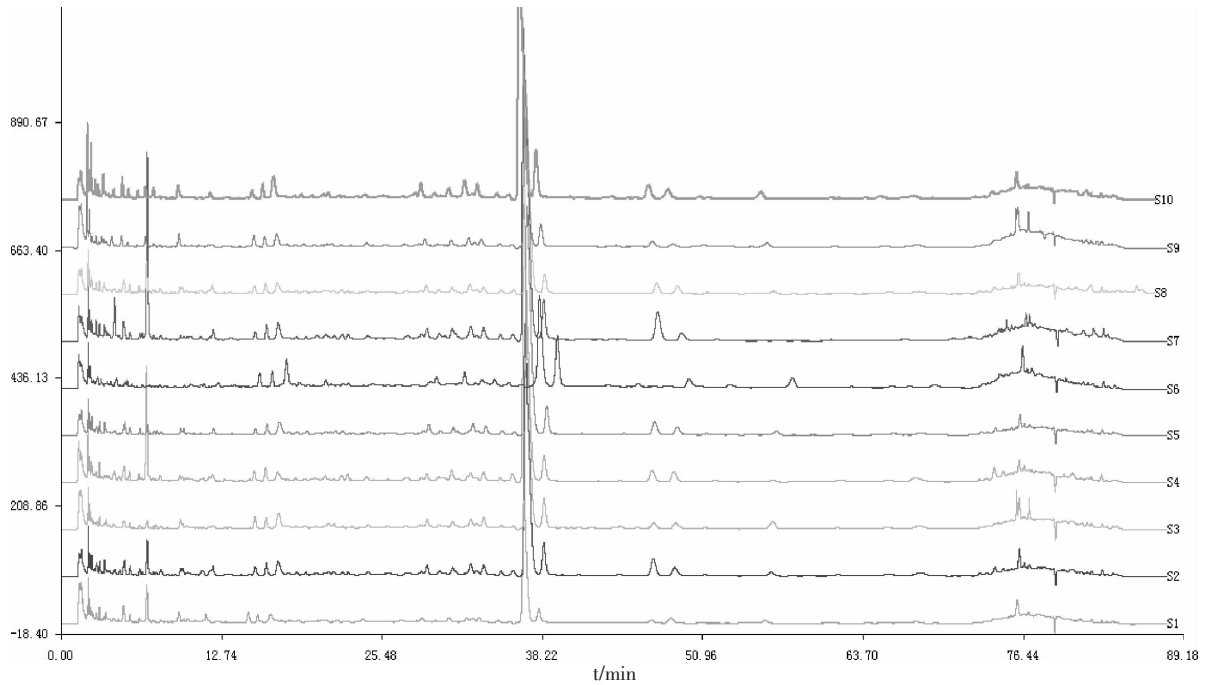


图1 10批不同产地乌药水提物的HPLC图谱

表1 10批乌药14个共有峰的峰面积

峰	保留时间/min	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
P1	1.592	275.768	538.914	278.296	169.922	120.727	597.901	296.663	507.343	280.466	128.577
P2	2.253	172.844	83.097	166.562	77.399	114.685	153.751	188.155	82.207	238.876	103.486
P3	2.435	71.458	111.969	40.006	123.929	139.139	6.646	111.227	85.690	54.862	351.014
P4	2.797	58.168	108.543	43.106	46.081	74.878	98.432	140.952	72.311	76.127	148.325
P5	3.042	92.054	84.407	74.141	117.773	86.287	50.838	107.400	75.480	25.035	94.032
P6	3.535	91.841	31.845	92.478	38.988	30.450	31.941	56.992	29.742	56.865	34.790
P7	6.810	505.730	472.511	116.386	1655.083	125.994	35.036	2658.522	433.396	132.190	182.993
P8	7.924	33.160	97.894	38.911	95.756	40.290	19.699	85.078	92.456	34.246	31.526
P9	36.919	5020.017	11982.75	8689.566	14010.55	10367.02	3992.115	16472.51	8942.151	7216.768	12823.02
P10	38.353	385.686	1229.636	938.472	1054.355	878.769	1754.125	1533.929	777.761	677.879	1602.033
P11	76.862	94.868	105.228	199.859	87.553	83.905	103.892	267.173	107.657	174.157	1095.107
P12	81.880	33.418	55.795	57.766	62.986	54.097	38.308	233.524	216.380	35.871	53.215
P13	82.709	38.395	82.331	61.954	107.343	61.885	97.179	139.178	63.329	75.569	67.032
P14	83.085	25.818	32.215	32.461	29.941	27.151	36.946	107.752	31.370	16.526	70.840

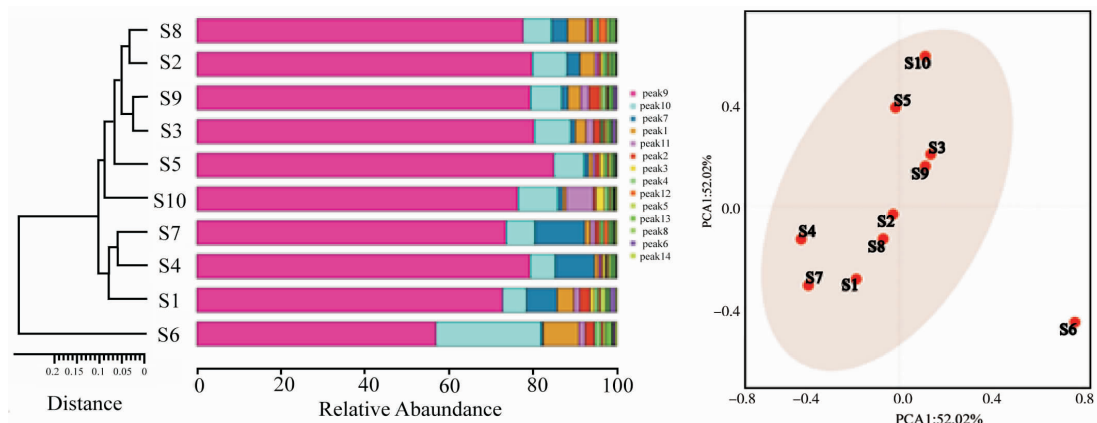


图2 聚类分析结果和主成分分析

窝深度显著变浅;与模型组相比,乌药水提取物低、中、高剂量组和阳性药物组中隐窝深度显著加深(图3A、B)。PSA染色结果(图3A、C)显示,IBS-D模型组大鼠结肠组织隐窝杯状细胞数目显著少于对照组($P<0.01$),而在中、高剂量的乌药水提取物和阳性药物干预下,IBS-D大鼠隐窝杯状细胞显著增加($P<0.05$)。上述研究表明,采用“番泻叶灌胃联合束缚应激”造模方法可成功制备IBS-D大鼠模型;乌药水提取物能显著改善IBS-D大鼠肠道低度炎症的症状。

3.5 乌药水提取物对IBS-D大鼠PPAR- γ /VCAM-1及SRC/YAP通路的影响

免疫组化结果显示,模型组大鼠结肠黏膜上皮细胞中YAP、PPAR- γ 和SRC的平均光密度显著低于对照组($P<0.01$),VCAM-1显著高于对照组($P<0.01$)。与IBS-D模型组相比,乌药水低、中、高剂量组和阳性药物组大鼠结肠黏膜上皮细胞中YAP、PPAR- γ 和SRC的平均光密度显著升高($P<0.05$),VCAM-1显著降低($P<0.05$)。详见图4。

Western blot结果显示与免疫组化一致。与对照组相比,模型组YAP和SRC蛋白相对表达量显著低于对照组($P<0.01$)。与模型组相比,乌药水提取物低、中、高剂量组和阳性药物组蛋白相对表达量显著

增加($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图5。

4 讨论

本研究基于HPLC法对湖南、河北和浙江等省10批乌药进行分析、检测,通过建立特征图谱,标定出14个共有峰。方法学考察结果表明,该分析方法稳定可靠、重现性较好。相似度分析结果显示,10批乌药样品与对照指纹图谱相似度为0.868~1.0,其中湖南、河北、广东产乌药与对照指纹图谱相似度较高(0.950~1.0),浙江产乌药与对照指纹图谱相似度较低(0.868~0.950)。通过聚类分析和主成分分析,可将10批乌药分为浙江乌药与其他产地乌药两类。聚类分析结果显示,湖南、河北、广东等不同地区的乌药聚为一类。由此可见,中药材乌药具有一定的产地适应性,各产地乌药质量基本稳定、可控。

Hippo信号通路是一条能够调控细胞分裂、增殖、分化和凋亡的信号通路,YAP是该通路上的一个效应因子,具有启动Hippo通路基因转录、翻译的能力^[13]。Hippo信号通路与器官发育、细胞增殖分化、免疫调节等生理活动密切相关。研究发现,Hippo信号通路上的关键激酶YAP在LGR5⁺肠道干细胞增殖分化,维持肠道干细胞稳态的生理过程中扮演着重要角色^[14]。LGR5⁺肠道干细胞是一类特异性表达

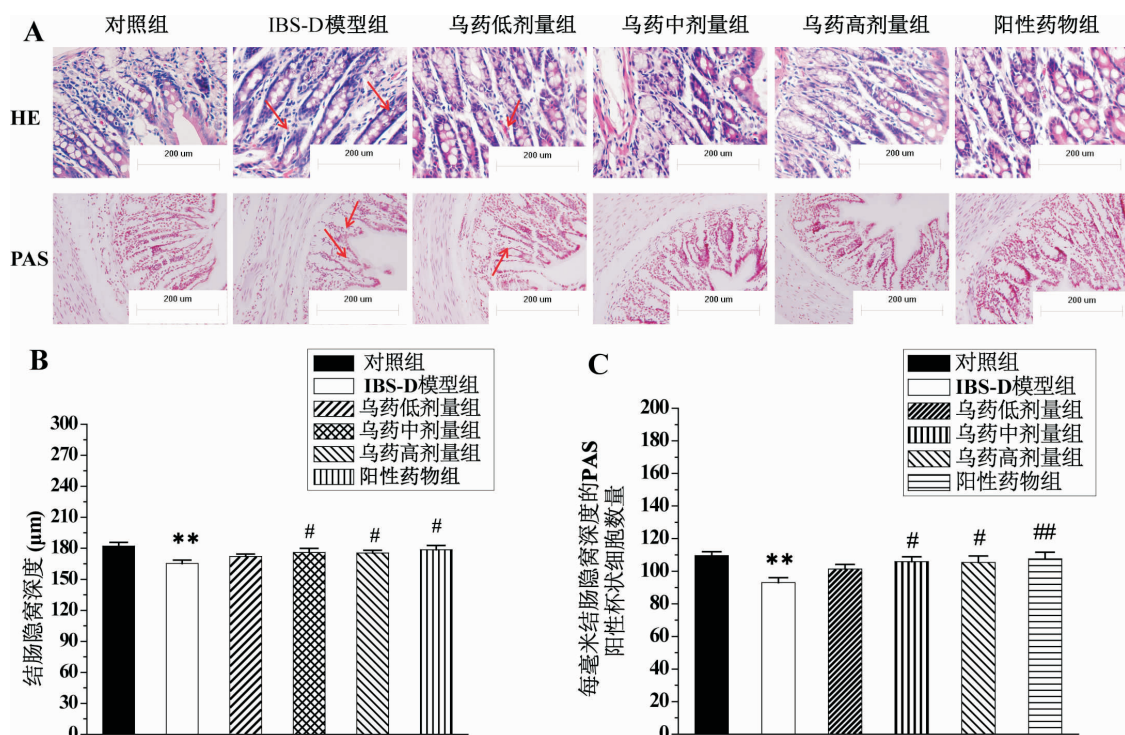


图3 乌药水提取物对IBS-D大鼠结肠组织形态及杯状细胞的影响

注:A.大鼠结肠组织HE染色($\times 400$)及PAS染色($\times 200$);B.结肠隐窝深度(μm)统计结果;C.每毫米结肠隐窝深度的PAS阳性杯状细胞数量统计结果($n=6$)。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

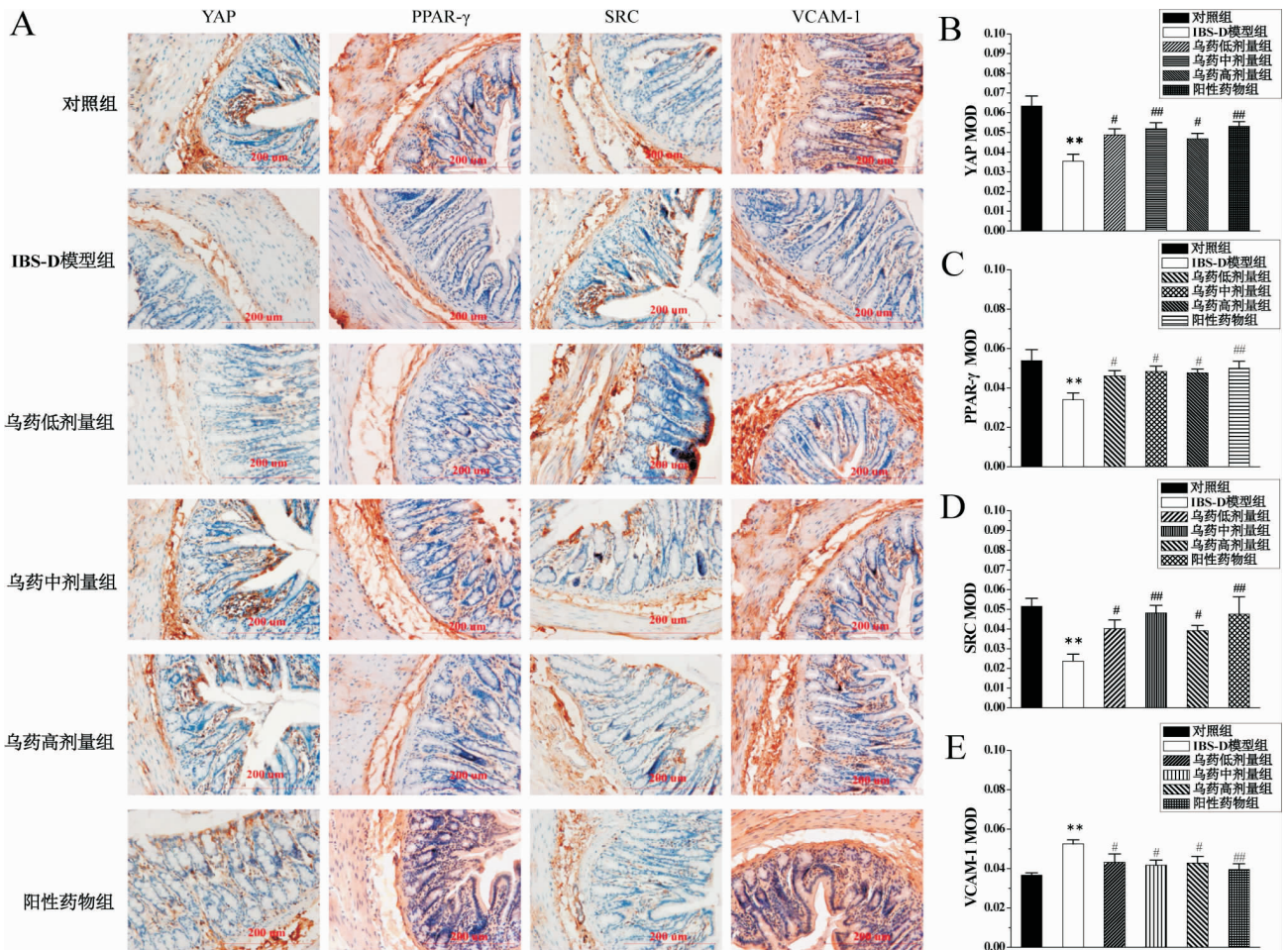


图4 乌药水提取物对IBS-D大鼠结肠组织YAP、PPAR- γ 、SRC和VCAM-1表达的影响

注:A大鼠结肠免疫组化图($\times 200$);B-E大鼠结肠组织各指标免疫组化统计结果($n=6$)。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

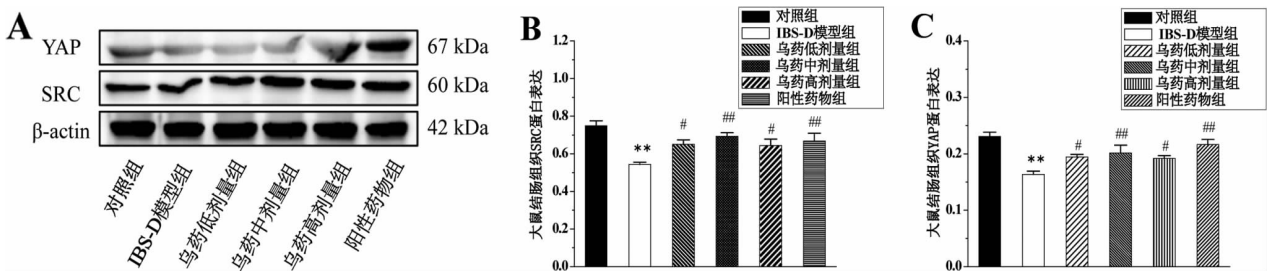


图5 乌药水提取物对IBS-D大鼠结肠组织YAP、PPAR- γ 、SRC和VCAM-1蛋白表达的影响

注:A.大鼠结肠SRC和YAP蛋白条带;B-C.大鼠结肠组织SRC和YAP蛋白表达结果统计图($n=6$)。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

LGR5、具有持续增殖分化功能的细胞,当LGR5⁺肠道干细胞增殖分化失衡或功能缺失可造成机体肠上皮修复障碍,从而诱发炎症性肠病、结直肠癌等一系列肠道疾病^[15]。FALLAH S等^[16]研究发现,YAP能够抑制杯状细胞、吸收性细胞等肠上皮细胞分化,该抑制作用与SRC家族激酶对Hippo通路介导有关。此外,TANIGUCHI K等^[17]研究发现,增强YAP和SRC蛋白表达能够促进炎症破坏后的肠道修复。由此提示,Hippo/YAP/SRC信号通路对修复肠道的破坏及改善肠道低度炎症症状具有重要意义。

PPAR- γ 为核受体超家族成员可在血管平滑肌、内皮细胞、巨噬细胞中表达^[18]。PPAR- γ 在炎症因子刺激下,其相对表达量会降低^[19]。此外,PPAR- γ 可调节VCAM-1、ICAM-1等细胞黏附分子和其他炎症介质的分泌和释放,从而对炎症反应起到一种负调控作用^[20]。研究表明,PPAR- γ 与NF- κ B之间存在一种双向拮抗作用^[21]。PPAR- γ 低表达会削弱了其对NF- κ B信号通路的抑制作用,从而增强VCAM-1蛋白表达,导致肠道炎症的发生、发展^[22]。

课题组前期基于网络药理学研究发现,乌药对

Hippo/YAP 和 PPAR- γ 信号通路具有调节作用^[6]。因此,本文在前期研究基础上,采用“番泻叶灌胃联合束缚应激”的方法制备 IBS-D 大鼠模型,进一步探讨乌药对 IBS-D 大鼠的作用机制。HE 和 PAS 染色结果表明,IBS-D 大鼠肠道存在低度炎症,而乌药水提物能显著改善 IBS-D 大鼠肠道低度炎症的症状。免疫组织化学和 Western blot 研究结果表明,乌药水提物能够增强 YAP 和 SRC 蛋白表达。由此提示,乌药水提物可能是通过增强 YAP 和 SRC 蛋白表达,抑制杯状细胞分化,促进肠道炎症的修复,最终改善 IBS-D 大鼠肠道低度炎症症状。此外,免疫组织化学结果显示,IBS-D 大鼠结肠黏膜上皮细胞中 PPAR- γ 平均光密度显著减少,VCAM-1 平均光密度显著增加;而乌药水提物能够显著升高 IBS-D 大鼠结肠黏膜上皮细胞中 PPAR- γ 光密度,显著降低 VCAM-1 光密度。由此提示,乌药水提物还可能通过 PPAR- γ /VCAM-1 通路改善 IBS-D 大鼠肠道炎症症状。

综上所述,本文通过 HPLC 技术对不同产地的乌药进行质量评价,证实被试的不同批次乌药质量稳定、可靠。此外,研究发现乌药治疗 IBS-D 大鼠低度炎症的作用机制可能与 PPAR- γ /VCAM-1 信号通路有关。

参考文献

- [1] 陈芳有,刘洋,谢丹,等.乌药化学成分及生物活性研究进展[J/OL].中国中药杂志,2023,48(21):5719-5726.
- [2] JIANG T, XU C Y, LIU H F, et al. Linderæ Radix ethanol extract alleviates diet-induced hyperlipidemia by regulating bile acid metabolism through gut microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 627920.
- [3] LOU Z H, WANG J W, CHEN Y J, et al. Linderæ radix ethanol extract attenuates alcoholic liver injury via attenuating inflammation and regulating gut microbiota in rats[J]. *Revista Brasileira De Pesquisas Medicas e Biologicas*, 2019, 52(6): e7628.
- [4] 欧阳林旗,蒋司晨,陈镇,等.乌药挥发油对寒凝气滞血瘀证大鼠血液流变学及 NO-sGC-cGMP 信号通路的影响[J].*中草药*, 2022, 53(15): 4730-4737.
- [5] 肖小芹,舒圆月,邓桂明,等.乌药水提液对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 Ghrelin、MTL、SP、Sec 水平的影响[J].*湖南中医药大学学报*, 2017, 37(5): 477-480.
- [6] 邓桂明,向彪,肖小芹,等.基于网络药理学的乌药主要化学成分药效作用研究[J].*中草药*, 2018, 49(21): 5125-5133.
- [7] VERGNOLLE N. Abdominal pain in irritable bowel syndrome[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 19(6): 350-350.
- [8] FORD A C, SPERBER A D, CORSETTI M, et al. Irritable bowel syndrome[J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1675-1688.
- [9] 池肇春.肠易激综合征低度炎症研究进展[J].*世界华人消化杂志*, 2022, 30(24): 1051-1065.
- [10] 舒圆月.乌药水提液对 IBS-D 大鼠胃肠功能及脑肠肽水平的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2017.
- [11] 管志伟,赵琼,赵中和,等.番泻叶致幼龄大鼠腹泻模型量-时-效关系研究[J].*时珍国医国药*, 2021, 32(8): 1806-1809.
- [12] ZHU H M, LI L, LI S Y, et al. Effect of water extract from *Berberis heteropoda* Schrenk roots on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by adjusting intestinal flora[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 237: 182-191.
- [13] SUN X, REN Z J, CUN Y X, et al. Hippo-YAP signaling controls lineage differentiation of mouse embryonic stem cells through modulating the formation of super-enhancers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(13): 7182-7196.
- [14] 郑美佳,贾瑞,魏海梁,等. Hippo-YAP 信号通路及 LGR5+ 肠道干细胞相关研究[J].*胃肠病学和肝病学杂志*, 2021, 30(4): 369-374.
- [15] ZHENG L, DUAN S L. Molecular regulation mechanism of intestinal stem cells in mucosal injury and repair in ulcerative colitis[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2023, 29(16): 2380-2396.
- [16] FALLAH S, BEAULIEU J F. Differential influence of YAP1 and TAZ on differentiation of intestinal epithelial cell: A review[J]. *Anatomical Record*, 2023, 306(5): 1054-1061.
- [17] TANIGUCHI K, WU L W, GRIVENNIKOV S I, et al. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration[J]. *Nature*, 2015, 519(7541): 57-62.
- [18] LIU X N, GU Y R, KUMAR S, et al. Oxylin-PPAR γ -initiated adipocyte senescence propagates secondary senescence in the bone marrow[J]. *Cell Metabolism*, 2023, 35(4): 667-684.
- [19] GARABUCZI É, TARBAN N, FIGE É, et al. Nur77 and PPAR γ regulate transcription and polarization in distinct subsets of M2-like reparative macrophages during regenerative inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1139204.
- [20] FRANCESCHELLI S, DE CECCO F, PESCE M, et al. Hydroxytyrosol reduces foam cell formation and endothelial inflammation regulating the PPAR γ /LXR α /ABCA1 pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 2057.
- [21] LIU X Y, ZHANG P, SONG X Q, et al. PPAR γ mediates protective effect against hepatic ischemia/reperfusion injury via NF- κ B pathway[J]. *Journal of Investigative Surgery: the Official Journal of the Academy of Surgical Research*, 2022, 35(8): 1648-1659.
- [22] ABDEL-WAHAB B A, ALKAHTANI S A, ALQAHTANI A A, et al. Umbelliferone ameliorates ulcerative colitis induced by acetic acid via modulation of TLR4/NF- κ B-p65/iNOS and SIRT1/PPAR γ signaling pathways in rats[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, 29(25): 37644-37659.

(本文编辑 苏维)