

本文引用: 邹巍莹, 刘 密, 余 炼, 宾东华. 参苓白术散对克罗恩病大鼠肠黏膜屏障的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43 (11): 2034–2040.

## 参苓白术散对克罗恩病大鼠肠黏膜屏障的影响

邹巍莹<sup>1</sup>, 刘 密<sup>1</sup>, 余 炼<sup>1\*</sup>, 宾东华<sup>2\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

**[摘要]** **目的** 观察参苓白术散对克罗恩病(Crohn's disease, CD)大鼠肠黏膜屏障的影响。**方法** 60只SD大鼠随机均分为空白组、模型组、美沙拉秦组(0.21 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)及参苓白术散高、中、低剂量组(5.88、11.76、23.52 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。采用2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)灌肠液制作CD模型。给药各组予以相应药物灌胃,空白组、模型组予以等剂量灭菌注射用水。监测每组大鼠在用药期间的体征变化,14 d后进行结肠黏膜损伤指数(colon injury morphology index, CMDI)评分、组织病理学观察,qPCR检测闭合蛋白(Occludin)、闭锁连接蛋白-1(zonulaoccludens-1, ZO-1)及E-钙黏蛋白(E-cadherin)的mRNA表达水平,Western blot法检测各组大鼠结肠组织中Occludin,ZO-1,E-cadherin蛋白表达水平。**结果** 与空白组对比,模型组大鼠体重明显下降,活动能力减弱,普遍出现稀便情况,少量大鼠出现便血及黏液便情况;CMDI评分显著升高( $P<0.01$ );黏膜可见上皮坏死脱落,内部腺体坏死,大量炎性细胞浸润;Occludin,ZO-1,E-cadherin的mRNA水平及蛋白表达均明显降低( $P<0.01$ )。与模型组对比,美沙拉秦组及参苓白术散低、中、高剂量组大鼠体重不同程度升高,大便基本成形,个别大鼠有少量便血,无明显黏液便;美沙拉秦组及参苓白术散高、中剂量组CMDI评分均降低( $P<0.01$ ),结肠黏膜损伤明显减轻;参苓白术散高剂量组Occludin,ZO-1,E-cadherin的mRNA水平及蛋白表达显著升高( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。**结论** 参苓白术散可能通过调控Occludin,ZO-1及E-cadherin mRNA及蛋白的表达,促进CD大鼠结肠黏膜屏障功能的修复,有效缓解CD大鼠肠黏膜屏障损伤。

**[关键词]** 参苓白术散;克罗恩病;美沙拉秦;闭合蛋白;E-钙黏蛋白;闭锁连接蛋白-1

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.016

## Effects of Shenling Baizhu Powder on intestinal mucosal barrier in rats with Crohn's disease

ZOU Weiyang<sup>1</sup>, LIU Mi<sup>1</sup>, YU Lian<sup>1\*</sup>, BIN Donghua<sup>2\*</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

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

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of Shenling Baizhu Powder (SLBZP) on the intestinal mucosal barrier in rats with Crohn's disease (CD). **Methods** Sixty SD rats were randomized into blank group, model group, mesalamine group (0.21 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and high-, medium-, and low-dose SLBZP groups (5.88, 11.76, 23.52 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). CD model was established by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) enema. Each treatment group was given the corresponding drug by gavage, and blank group and model group were given equal doses of sterilized water for injection. The changes in the signs of each group during the medication period were monitored. After 14 days, the colon injury morphology index (CMDI) score and histopathological observation were performed, qPCR was used to determine the mRNA expression levels of occludin, zonulaoccludens-1 (ZO-1) and E-cadherin. Western blot was used

[收稿日期]2023-05-08

[基金项目]湖南省中医药科研计划一般项目(E2022035);湖南省教育厅科学研究项目优秀青年项目(21B0395);湖南省中医药科研计划一般项目(E2022035);湖南中医药大学校级科研基金项目(2021XJJ024)。

[第一作者]邹巍莹,女,硕士研究生,研究方向:炎性肠病的中医药研究。

[通信作者]\*余 炼,男,硕士,副教授,E-mail:yulian@hnuem.edu.cn;宾东华,男,博士,主任医师,副教授,E-mail:bindonghua@163.com。

to determine the expression levels of occludin, ZO-1 and E-cadherin proteins in the colon tissues of rats in each group. **Results** Compared with blank group, rats in model group showed significant decrease in body mass, reduced mobility, and generally loose stools, with a small number of rats showing blood and mucus stools. The CMDI score was significantly higher ( $P<0.01$ ). Epithelial necrosis and detachment, necrosis of internal glands, and infiltration of a large number of inflammatory cells were seen in the mucosa. The mRNA levels and protein expressions of occludin, ZO-1, and E-cadherin were significantly reduced ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the body mass of rats in mesalazine group and the low-, middle- and high-dose SLBZP groups increased to different degrees, and the stools were basically formed. Some rats had mild hematochezia and no obvious mucus stools. The CMDI scores in mesalazine group and the high- and middle- dose groups decreased ( $P<0.01$ ), and the injury of colon mucosa was obviously alleviated. The mRNA levels and protein expressions of occludin, ZO-1, and E-cadherin in the high-dose SLBZP group were significantly higher ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). **Conclusion** SLBZP may promote the repair of colonic mucosal barrier function in CD rats by increasing mRNA and protein expressions of occludin, ZO-1 and E-cadherin, so as to effectively alleviate the intestinal mucosal barrier injury in rats with Crohn's disease.

[**Keywords**] Shenling Baizhu Powder; Crohn's disease; mesalazine; occludin; e-cadherin; zonulaoccludens-1

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是炎性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的主要类型之一,是一种局部限制性、反复发作性、病因不明的慢性IBD,病变可涉及全消化道<sup>[1]</sup>。CD主要表现为反复发作的腹痛、血性腹泻或黏液便,严重时出现肠道溃疡、内瘘、肠梗阻等,甚至可并发营养不良、贫血、低蛋白血症等全身症状,对患者的健康及生存质量造成了严重影响<sup>[2]</sup>。迄今为止,CD的临床治疗以减少复发、预防并发症和延缓疾病进程为主,尚无彻底治愈的方案。CD的发病机制与肠黏膜屏障功能相关。复杂的环境因素干扰诱导紊乱的免疫反应,最终导致肠道屏障功能的缺陷,肠黏膜屏障受损进一步引发异常持续的免疫激活,进而加重肠道炎症<sup>[3]</sup>。实现黏膜愈合或组织学缓解已被强调为CD更理想的治疗目标。因此,迫切需要阐明参与肠上皮屏障调节的分子机制并开发新的CD治疗方法。紧密连接的完整性与肠黏膜屏障密切相关,其主要由紧密连接蛋白闭锁连接蛋白-1(zonulaoccludens-1, ZO-1)等外周胞浆蛋白及闭合蛋白(Occludin)等膜蛋白组成。研究提示,紧密连接蛋白ZO-1可能是黏膜是否愈合的重要指标<sup>[4]</sup>。而紧密连接关键蛋白Occludin、ZO-1的低表达可能是黏膜损伤的关键因素<sup>[5]</sup>。E-钙黏蛋白(E-cadherin)在正常上皮组织的修复中起着关键作用。E-cadherin不仅影响肠上皮细胞之间的相互黏附,还与肠道黏膜的选择透过性紧密相关<sup>[6]</sup>。因此,肠黏膜屏障结构与功能的修复是CD治疗中的重要靶点<sup>[7]</sup>。

参苓白术散对于IBD有着良好的治疗效果。参

苓白术散药物性状稳定,根据辨证论治后加减用药,缓解CD患者临床症状效果明显<sup>[8]</sup>。现代研究证明,参苓白术散具有提高免疫力、调节肠道菌群、影响胃肠道分泌及吸收、改善代谢以及修复黏膜等功能<sup>[9]</sup>。参苓白术散治疗可减轻实验性结肠炎小鼠的病理症状,其药理机制包括重建抗炎环境以及创建有利于黏膜愈合的健康微生物群<sup>[10]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF级SD大鼠,60只,雌雄各半,6~7周龄,体质量190~210g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心,饲养温度24~26℃,相对湿度50%~70%,自由摄食饮水,适应性喂养3d。动物实验严格遵照湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会标准(编号ZYFY0220-01)。

### 1.2 主要药物与试剂

参苓白术散各药物购自湖南中医药大学第一附属医院药房,经医院制剂中心鉴定,符合用药标准。美沙拉秦缓释颗粒剂(中国医药集团有限公司,国药准字:H20143164,规格:500mg×10袋);4%多聚甲醛(北京白鲨易科技有限公司,批号:BL539A);2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-three nitrobenzene sulfonic acid, TNBS)、戊巴比妥钠、焦碳酸二乙酯水(美国Sigma公司,批号:P2297、P3761、40718);qPCR超级混合液(北京全式金生物技术股份有限公司,批号:AQ601-

04);RNase 抑制剂、脱氧核糖核苷酸三磷酸、逆转录酶(美国 Thermo 公司,批号:E00381、GD1102、EP0441);脱氧核糖核酸酶水、TB Green 染料法标准型定量试剂盒、含去 gDNA 的定量反转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号:TKR-9012、TKR-RR820A、TKR-RR047A);RIPA 裂解液(强)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0013B、P0012);PVDF 膜(德国 Merck Millipore 公司,批号:IPVH00010);Occludin、ZO-1、E-cadherin(美国 Abcam 公司,批号:Ab216327、Ab276131、Ab40772);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(美国 Proteintech 公司,批号:60004-1-Ig);抗兔 IgG(H+L)抗体、抗小鼠 IgA+IgG+IgM(H+L)抗体(美国 KPL 公司,批号:074-1506、074-1807)。

### 1.3 主要仪器

JK-6 型生物组织摊烤片机(中国武汉俊杰电子有限公司);DM2000 LED 型光学显微镜(德国 Leica 公司);DW-86L338A 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司);BBS-SDC 型超净工作台(苏州集团安泰空气技术有限公司);R21010E 型微量移液器(德国 Eppendorf 公司);QuantStudio 1 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);LS-50HD 型立式圆形压力蒸汽灭菌锅(江阴滨江医疗设备有限公司);H2100R 型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Heraeus Fresco 17 型离心机、Nanodrop One 型核酸蛋白浓度测定仪(美国 Thermo 公司);T100 型梯度 PCR 扩增仪(山东博科科学仪器有限公司);DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司);eBlotTmL1 型快速转膜仪(金斯瑞生物科技股份有限公司);TS-8 型水平脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);ELX800 型酶标仪(美国 BioTek 公司)。

## 2 方法

### 2.1 模型制备

参考 MORRIS<sup>[11]</sup>的造模方法,将 60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,使用 TNBS 灌肠液制备 CD 模型。WIRTZ<sup>[12]</sup>支持 TNBS 造模方法有效。正常饮水、禁食 24 h 后,将无水乙醇与灭菌用水混合,配成 50%的乙醇,再将 5% TNBS 与 50%乙醇按 1:1 比例混合,得到灌肠液。使用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,灌肠液以 3 mL·kg<sup>-1</sup> 剂量进行灌肠。空白组大

鼠用同体积灭菌用水行灌肠操作。隔 7 天重复灌肠 1 次,共 2 次,观察大鼠食欲、体质量、大便情况,每组随机处死 2 只大鼠,从肛门向上取结肠(15±2) cm,沿纵轴剪开,用生理盐水清洗,观察发现大鼠结肠肠壁增厚、黏膜充血水肿或有溃疡即为造模成功<sup>[12]</sup>。

### 2.2 参苓白术散药液的制备

参照《方剂学》<sup>[13]</sup>中参苓白术散的组方,实验药液的药物组成为:白术 15 g,山药 15 g,莲子肉 9 g,白茯苓 15 g,薏苡仁 9 g,桔梗 6 g,缩砂仁 6 g,白扁豆 12 g,人参 15 g,甘草 10 g。生药量共 112 g,浸泡 30 min 后分别以 8 倍水、6 倍水煎煮后,两次的煎液混合过滤,用水浴锅浓缩至 2.94 g/mL,存于 4 ℃ 冰箱备用。

### 2.3 分组与给药

采用随机数字法,将 60 只 SD 大鼠分为空白组(10 只)及造模组(50 只)。造模成功后再将造模组随机分为模型组、美沙拉秦组及参苓白术散高、中、低剂量组,每组 10 只。造模后每组随机处死 2 只大鼠,每组剩 8 只。药物均以灭菌用水作溶剂配制,用药剂量折算以大鼠体表面积换算公式为计算标准,大鼠每天给药剂量=成人临床剂量×6.3(人与大鼠体表面积折算系数)/成人体质量(60 kg)。所有大鼠自由饮食,造模成功后开始灌胃给药。美沙拉秦组给予美沙拉秦药液(0.21 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃,参苓白术散低、中、高剂量组给予参苓白术散药液(5.88、11.76、23.52 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃,空白组和模型组灌胃同体积灭菌用水,每天 1 次,连续灌胃给药 14 d。

### 2.4 指标检测

2.4.1 一般情况观察及结肠黏膜损伤指数(colon injury morphology index, CMDI)评分 观察各组大鼠每天体质量变化、活跃程度、粪便是否成形、有无血便及黏液便。取材后,根据大鼠 CMDI 评分<sup>[14]</sup>标准进行评分:黏膜完整为 0 分;轻度充血,黏膜表面无糜烂、溃疡为 1 分;中度充血,黏膜表面出现糜烂为 2 分;黏膜表面严重充血、溃疡甚至坏死,主要溃疡面积<40%为 4 分;黏膜表面严重充血、溃疡甚至坏死,主要溃疡面积>40%为 5 分。

2.4.2 HE 染色观察结肠组织病理改变情况 选取各组大鼠结肠组织,石蜡固定,脱掉组织中的水分,切成 4 μm 厚度的连续切片,干燥,脱蜡,二甲苯透明后封片。封片后,在光学显微镜下观察结肠组

织的病理变化。

2.4.3 qPCR 检测各组大鼠结肠组织中 Occludin、ZO-1、E-cadherin 的 mRNA 的表达 向样本中加入 500  $\mu\text{L}$  Trizol 试剂,加入氯仿于 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min (12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心半径 6 cm),加入异丙醇再次 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min (12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心半径 6 cm),提取沉淀颗粒,洗涤,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min (7 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心半径 6 cm),静置,干燥,随后使用核酸蛋白浓度测定仪测量并记录 RNA 浓度。按反应数+2 的量配制 Master Mix,取 10  $\mu\text{L}$  分装到反应管,将反应管置于梯度 PCR 扩增仪 (37  $^{\circ}\text{C}$  15 min; 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 体积 20  $\mu\text{L}$ ) 逆转录成 cDNA。以逆转录产物 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增实验。依据原始检测结果,运用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 mRNA 的相对表达量。引物信息来源于美国国家生物技术信息中心,运用 Primer 5 软件设计,由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。每组取 6 只大鼠结肠组织用于检测 mRNA 含量。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	正向 GCAAGTTCAACGGCACAG	140
	反向 GCCAGTAGACTCCACGACAT	
Occludin	正向 TCCTCTGACCTTGCCGTG	121
	反向 GTCTGTCTCTTCGCCTTC	
E-cadherin	正向 TTCAACCCAAGCACGTACCA	118
	反向 TGTACACAGCATTCACGCT	
ZO-1	正向 ATGTTGGTATGGTGCCCTG	90
	反向 TTGTAGACCATCCGCCTTC	

2.4.4 Western blot 检测各组大鼠结肠组织中 Occludin、ZO-1、E-cadherin 的蛋白表达 剪取适量结肠组织,研磨匀浆,PBS 洗涤后加入 RIPA 裂解液,研磨后置于冰上裂解 30 min,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  (离心半径 8.6 cm),4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min 后取上清液。使用 BCA 工作液,将样品加入 BCA 工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,用酶标仪测定,计算蛋白浓度。制胶,予以上样、电泳、转膜、封闭、稀释及孵育一抗 (Occludin 稀释比例为 1:500; ZO-1 稀释比例为 1:500; E-cadherin 稀释比例为 1:1 000),洗膜后孵育二抗 (均以 1:5 000 稀释),再次洗膜后进行显影。每组取 6 只大鼠结肠组织用于检测蛋白含量。

## 2.5 统计学分析

使用统计软件 SPSS 27.0 分析数据,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,

组间比较采用 LSD 检验;若不满足正态性则使用 Kruskal-Wallis H 检验, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 参苓白术散对 CD 大鼠 CMDI 评分的影响

空白组大鼠活动度及饮食正常,粪便成颗粒状。与空白组相比,模型组、美沙拉秦组、参苓白术散各剂量组在造模第 1 天后出现稀便,甚则可见血便、黏液便,饮食活动均较前减少,第 2 次灌肠后症状加重。给药 14 d 后,与空白组比较,模型组大鼠体质明显减轻,活动能力减弱,普遍出现稀便,少量大鼠出现便血及黏液便;与模型组相比,美沙拉秦组及参苓白术散各剂量组大鼠体质较造模后不同程度升高,大便基本成形,个别大鼠有少量便血,无明显黏液便。

与空白组对比,模型组 CMDI 评分明显升高 ( $P<0.01$ ),结肠出现明显糜烂面。与模型组对比,用药组结肠未见糜烂,美沙拉秦组及参苓白术散低剂量组充血水肿较明显;美沙拉秦组及参苓白术散高、中剂量组 CMDI 评分均降低 ( $P<0.01$ )。与美沙拉秦组对比,参苓白术散低剂量组 CMDI 评分升高 ( $P<0.05$ )。详见图 1、表 2。

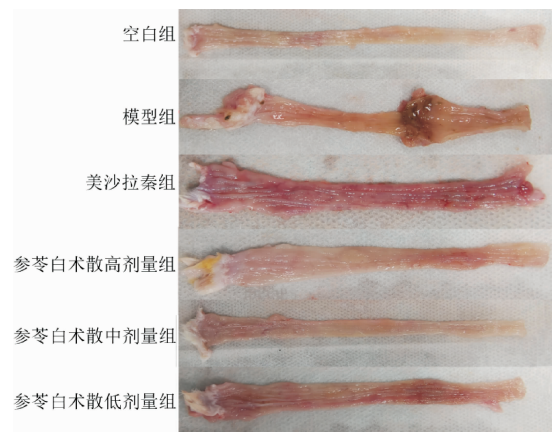


图 1 各组大鼠结肠解剖形态

表 2 各组大鼠 CMDI 评分比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

组别	CMDI 评分/分
空白组	0
模型组	3.50 $\pm$ 0.51**
美沙拉秦组	1.74 $\pm$ 0.47 <sup>##</sup>
参苓白术散高剂量组	1.45 $\pm$ 0.32 <sup>##</sup>
参苓白术散中剂量组	1.89 $\pm$ 0.74 <sup>##</sup>
参苓白术散低剂量组	2.99 $\pm$ 0.55 <sup>▲</sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与美沙拉秦组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

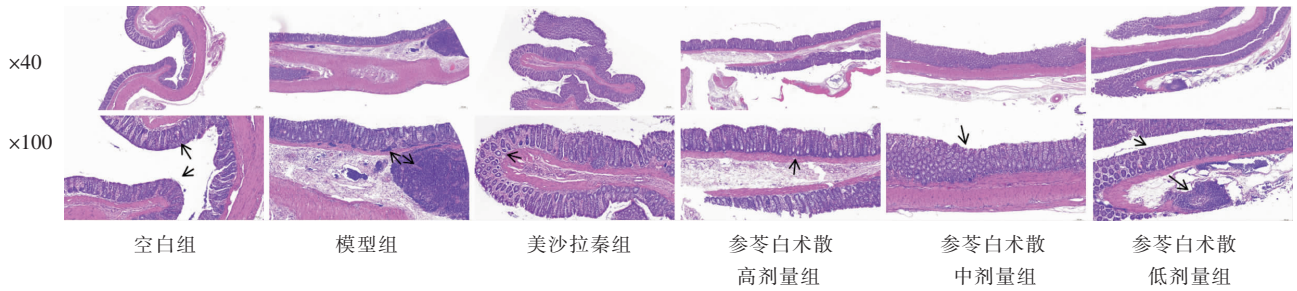


图 2 各组大鼠结肠病理 HE 染色图  
注:箭头所示为病变较明显处。

### 3.2 参苓白术散对 CD 大鼠结肠组织的影响

空白组结肠黏膜结构正常,无损伤,腺体无明显形态上的改变。与空白组比较,模型组见大量黏膜上皮腺体坏死,轻度黏膜上皮脱落,黏膜下层明显水肿,黏膜固有层及下层可见大量炎性细胞浸润。与模型组比较,各用药组黏膜损伤明显减轻。美沙拉秦组黏膜层可见部分黏膜层充血水肿,少量炎性细胞浸润,腺体萎缩;参苓白术散低剂量组可见充血水肿,少量炎性细胞浸润;参苓白术散中剂量组部分可见炎症反应,正常结构居多;参苓白术散高剂量组大部分黏膜结构完好,稍有炎症反应。详见图 2。

### 3.3 参苓白术散对 CD 大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1、E-cadherin mRNA 表达水平的影响

与空白组比较,模型组大鼠 Occludin、ZO-1、E-cadherin 的 mRNA 表达显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),提示肠道黏膜受损。与模型组比较,美沙拉秦组及参苓白术散中、高剂量组 Occludin、ZO-1、E-cadherin mRNA 表达水平升高( $P<0.05, P<0.01$ );参苓白术散低剂量组 Occludin、ZO-1 mRNA 表达水平升高( $P<0.01$ )。与美沙拉秦组相比,参苓白术散中、高剂量组 Occludin、ZO-1 mRNA 表达水平升高( $P<0.05$ );参苓白术散低剂量组 Occludin mRNA 表达水平降低( $P<0.05$ ),ZO-1 mRNA 表达水平升高( $P<0.05$ )。详见表 3。

### 3.4 参苓白术散对 CD 大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1、E-cadherin 蛋白表达水平的影响

与空白组比较,模型组 Occludin、ZO-1、E-cadherin 的蛋白表达水平降低( $P<0.01$ ),提示肠道黏膜受损。与模型组比较,美沙拉秦组及参苓白术散中、高剂量组 Occludin、E-cadherin、ZO-1 蛋白表达水平升高( $P<0.01, P<0.05$ );参苓白术散低剂量组 Occludin

表 3 各组大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1、E-cadherin mRNA 表达水平比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	Occludin mRNA	ZO-1 mRNA	E-cadherin mRNA
空白组	16.70±0.59	1.29±0.08	1.48±0.06
模型组	5.58±0.99**	0.56±0.06**	0.45±0.03**
美沙拉秦组	9.50±0.64*** <sup>#</sup>	0.66±0.08*** <sup>#</sup>	1.02±0.04 <sup>#</sup>
参苓白术散高剂量组	20.11±0.82*** <sup>#▲</sup>	1.09±0.12*** <sup>#▲</sup>	1.33±0.05 <sup>#</sup>
参苓白术散中剂量组	15.38±0.92 <sup>#▲</sup>	0.98±0.07*** <sup>#▲</sup>	0.97±0.05*** <sup>#</sup>
参苓白术散低剂量组	7.29±1.48*** <sup>#▲</sup>	0.82±0.09*** <sup>#▲</sup>	0.57±0.01**

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与美沙拉秦组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。与美沙拉秦组比较,参苓白术散高剂量 Occludin、ZO-1 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ );参苓白术散中剂量组 E-cadherin 蛋白表达水平下降( $P<0.05$ );参苓白术散低剂量组 Occludin、E-cadherin 蛋白表达水平下降( $P<0.05$ )。详见图 3、表 4。

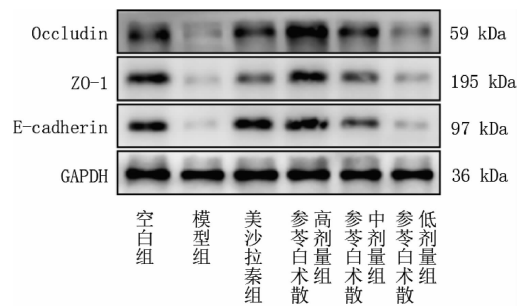


图 3 各组大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1、E-cadherin 蛋白表达条带图

## 4 讨论

CD 是一种病因不明的反复发作的肠道黏膜慢性炎症,可以影响全消化道,常见症状为腹泻、腹痛、体质量减轻、发热、肠道出血等。25%的患者仅累及结肠,25%的患者仅累及回肠,50%的患者累及回肠、结肠,大约 33%的患者肛周受累,5%~15%的患

表4 各组大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1、E-cadherin 蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	Occludin/GAPDH	ZO-1/GAPDH	E-cadherin/GAPDH
空白组	4 994.06±617.02	5 618.36±204.71	6 170.88±750.50
模型组	1 002.97±89.67**	999.29±70.32**	785.55±179.06**
美沙拉秦组	4 388.26±678.35 <sup>#</sup>	3 457.88±220.87 <sup>#</sup>	6 771.80±616.05 <sup>#</sup>
参苓白术散高剂量组	6 226.40±923.11*** <sup>▲</sup>	5 808.58±331.19 <sup>#▲</sup>	7 072.70±908.22 <sup>#</sup>
参苓白术散中剂量组	3 972.59±266.41***	4 017.85±211.65 <sup>#</sup>	4 652.83±690.46*** <sup>▲</sup>
参苓白术散低剂量组	1 834.76±348.70*** <sup>▲</sup>	1 409.53±83.01**	1 246.31±279.37*** <sup>▲</sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与美沙拉秦组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

者存在口腔或胃十二指肠区域受累<sup>[15]</sup>。疾病没有得到有效控制的情况下,大多数患者通常会从黏膜进展为透壁性疾病,导致穿透性或狭窄性并发症。并且多达 67% 的 CD 患者在其一生中需要手术干预,如肠切除术、狭窄成形术或脓肿引流<sup>[15]</sup>。手术切除最常见的适应证是医学难治性疾病如穿孔、持续或复发性梗阻、不适合经皮引流的脓肿、顽固性出血、异型增生或癌症<sup>[10]</sup>。CD 炎症损害上皮屏障的完整性,严重者甚至穿透肠壁,破坏肠黏膜上皮屏障功能及其通透性。因此,抑制肠道炎症反应,促进肠黏膜屏障结构与功能的修复,有助于肠道黏膜愈合及实现组织学缓解。中医学难以用一个病名概括 CD 全过程的特点及规律。CD 不同的阶段临床表现不一,根据其临床表现少腹拘急疼痛伴有发热,将其归于“肠痈”范畴;腹部疼痛为主,归于“腹痛”范畴;大便带鲜红色、暗红色或紫色,归于“便血”范畴;腹痛、里急后重、排黏液脓血便,归于“痢疾”范畴;肛门外有硬结破溃、流水不止者归于“痔漏”范畴;出现疲倦乏力、消瘦者归于“虚劳”范畴等<sup>[16]</sup>。

参苓白术散出自《太平惠民和剂局方·卷三》,方中人参、山药使气化生源,培土生金,从肺治肠;白术、茯苓运化水湿,助肠道从源头渗湿止泻;人参、白术、茯苓合而为君。莲子肉性收敛,固涩止泻;白扁豆、薏苡仁健脾化湿,山药、莲子肉、白扁豆、薏苡仁共为臣。砂仁为佐药,不仅能加强君臣药除湿的力度,更能调畅阻滞的气机;桔梗宣肺利气、通调水道,又能载药上行;炙甘草益气和中、调和诸药<sup>[8]</sup>。相关研究表明,参苓白术颗粒可以通过抗炎、抗氧化应激和黏膜修复明显降低血清中的炎症指标含量<sup>[17]</sup>;参苓白术散可以通过影响肠道黏膜组织中相关细胞因子,修复肠道黏膜屏障<sup>[18]</sup>;参苓白术散可以通过抑制

TLR5/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,改善黏蛋白保护作用及维持肠道屏障的完整性<sup>[19]</sup>。

本研究结果发现,与空白组对比,模型组大鼠体质量明显减轻,活动能力减弱,普遍出现稀便,少量大鼠出现便血及黏液便,CMDI 评分显著升高,HE 染色可见明显的黏膜上皮坏死、腺体坏死,黏膜固有层、黏膜下层均见炎性细胞浸润,提示 CD 大鼠肠道黏膜受损。与模型组对比,美沙拉秦组及参苓白术散低、中、高剂量组大鼠体质量不同程度升高,大便基本成形,个别大鼠有少量便血,无明显黏液便。美沙拉秦组及参苓白术散高、中剂量组 CMDI 评分均降低,结肠黏膜损伤明显减轻。而紧密连接在上皮和内皮单层的相邻细胞之间进行细胞间连接,构成组织结构的完整,保持屏障正常的通透性。紧密连接复合体结构由多种蛋白构成,包括 Occludin 等跨膜蛋白家族、外周膜蛋白 ZO 家族及调节蛋白等,组成的细胞骨架结构提供了紧密连接支撑并保持细胞形状的拉伸强度<sup>[20]</sup>。Occludin 是一种四跨整合膜蛋白,有助于紧密连接的稳定,保持最佳屏障功能,维持机体内环境稳定,也可以阻止肠内细菌和大分子物质通过固有层,是机体重要的肠道保护屏障。作为紧密连接组成成分的 ZO-1 能利用肌丝将跨膜蛋白和细胞骨架系统互相连接<sup>[21]</sup>,构成稳定的连接系统。E-cadherin 是在结肠隐窝上皮中表达的主要钙黏蛋白,其水平在隐窝基部较低,在隐窝顶端表达强烈,参与肠道屏障的形成<sup>[22]</sup>,是组织屏障形成的基础,是组成上皮组织的关键;E-cadherin 是上皮黏附连接的核心成分,对组织发育、分化和维持至关重要<sup>[23]</sup>。本研究结果表明,参苓白术散高剂量组 Occludin、ZO-1、E-cadherin 的 mRNA 表达及蛋白表达水平较模型组显著升高,提示参苓白术散可以促进 Occludin、ZO-1、E-cad-

herin 表达,从而促进肠黏膜屏障功能的修复。相关研究表明,参苓白术散能促进紧密连接蛋白表达,从而改善 IBD,改善肠黏膜屏障功能<sup>[19]</sup>。同时有研究证明,Occludin、ZO-1 蛋白的阳性表达率的提高能促进黏膜修复<sup>[24]</sup>。

综上,参苓白术散可能通过增加 Occludin、ZO-1 及 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达,促进 CD 大鼠结肠黏膜屏障功能的修复,有效缓解 CD 大鼠肠黏膜屏障损伤。本次实验样本量小,是否存在通路调节紧密连接蛋白协同发挥作用,仍有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] PARK S H, PARK J C, LUKAS M, et al. Biosimilars: Concept, current status, and future perspectives in inflammatory bowel diseases[J]. *Intestinal Research*, 2020, 18(1): 34-44.
- [2] KEDIA S, DAS P, MADHUSUDHAN K S, et al. Differentiating Crohn's disease from intestinal tuberculosis[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(4): 418-432.
- [3] ZHUANG X J, CHEN B L, HUANG S S, et al. Hypermethylation of miR-145 promoter-mediated SOX9-CLDN8 pathway regulates intestinal mucosal barrier in Crohn's disease[J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103846.
- [4] 谭悦, 郑长清. 紧密连接蛋白 occludin、ZO-1 在溃疡性结肠炎中的表达及其临床意义[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(7): 1803-1808.
- [5] 张冰, 谢晶日, 孙涛. 肠愈宁对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 claudin-1、ZO-1、occludin 蛋白表达的影响[J]. *中华全科医学*, 2021, 19(9): 1447-1450, 1577.
- [6] PEGLION F, LLENSE F, ETIENNE-MANNEVILLE S. Adherens junction treadmill during collective migration[J]. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(7): 639-651.
- [7] IMENSHAHIDI M, HOSSEINZADEH H. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review[J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(3): 504-523.
- [8] 余炼, 宾东华, 尹园缘, 等. 从“培土生金, 肺合大肠”角度探析参苓白术散防治炎性肠病思路[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14): 186-193.
- [9] 陈明冰, 谢胜, 戴文杰, 等. 参苓白术散在消化系统疾病中的应用及机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(10): 164-166.
- [10] YU W, WANG G L, LU C, et al. Pharmacological mechanism of Shenlingbaizhu formula against experimental colitis[J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine*, 2022, 98: 153961.
- [11] MORRIS G P, BECK P L, HERRIDGE M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795-803.
- [12] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(7): 1295-1309.
- [13] 李冀, 连建伟. 方剂学[M]. 新世纪第四版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 123.
- [14] SHAH T A, PARIKH M, PATEL K V, et al. Evaluation of the effect of Punica granatum juice and punicalagin on NF- $\kappa$ B modulation in inflammatory bowel disease[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, 419(1/2): 65-74.
- [15] GAJENDRAN M, LOGANATHAN P, CATINELLA A P, et al. A comprehensive review and update on Crohn's disease[J]. *Disease-a-month*, 2018, 64(2): 20-57.
- [16] 赵延华, 赵智强. 略论克罗恩病的中医认识[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(5): 410-412.
- [17] 熊艳玲, 钟慧文, 陈雅茜, 等. 基于抗炎和氧化应激角度研究参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的作用机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(2): 149-157.
- [18] 周华, 张敏, 吴芳, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎的抗炎作用及机制研究[J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(19): 1455-1460.
- [19] RAO K H, QIN S M, YANG Y M, et al. Shenling Baizhu Powder alleviates TNBS-induced colitis in rats by improving intestinal epithelial permeability and inhibiting inflammation through the TLR5/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 883918.
- [20] HOROWITZ A, CHANEZ-PAREDES S D, HAEST X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 20(7): 417-432.
- [21] PIZZUTI D, BORTOLAMI M, MAZZON E, et al. Transcriptional downregulation of tight junction protein ZO-1 in active coeliac disease is reversed after a gluten-free diet[J]. *Digestive and Liver Disease*, 2004, 36(5): 337-341.
- [22] DAULAGALA A C, BRIDGES M C, KOURTIDIS A. E-cadherin beyond structure: A signaling hub in colon homeostasis and disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2756.
- [23] 王茜, 成细华, 刘春燕, 等. 六味地黄汤含药血清对 CoCl<sub>2</sub> 诱导 HK-2 细胞后 E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(4): 557-563.
- [24] 马秀兰, 王佳林, 张兴艳, 等. 复方蜥蜴散凝胶对溃疡性结肠炎模型大鼠 Cingulin、Occludin、ZO-1 蛋白的表达影响[J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(8): 7-10, 146.