

# 参苓白术散治疗炎症性肠病 与肠上皮细胞紧密连接的关系探讨

刘玉晖<sup>1</sup>, 胡婕<sup>1</sup>, 易文凤<sup>1</sup>, 游宇<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006)

**[摘要]** **目的:**探讨参苓白术散通过肠上皮细胞紧密连接对抗5%葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠肠炎(IBD)的作用机制。**方法:**48只SPF级BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组、柳氮磺胺吡啶组、参苓白术散低、中、高剂量组,除正常组之外,5% DSS自由饮用7 d诱导BALB/c小鼠急性炎症性肠病,参苓白术散高、中、低剂量组*ig*分别给予12,6,3 g·kg<sup>-1</sup>参苓白术散,正常组和模型组*ig*等体积生理盐水,柳氮磺胺吡啶组*ig*给予柳氮磺胺吡啶2 g·kg<sup>-1</sup>,15 d后观察小鼠体重、粪便性状、隐血便血,计算疾病活动度(DAI)积分、病理检测肠黏膜病变。采用Western blot和RT-PCR检测闭合蛋白(Claudin)水平变化和咬合蛋白(Occluding),Claudin,胞浆附着蛋白(ZO-1)和细胞间连接黏附分子(JAM)mRNA表达。**结果:**与正常组相比,模型组Claudin蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),Occluding,Claudin,ZO-1和JAM mRNA水平降低( $P < 0.05$ );给药后,与模型组相比,柳氮磺胺吡啶组、参苓白术散低、中、高剂量组Claudin蛋白表达量明显升高( $P < 0.05$ ),各给药组的Occluding,Claudin,ZO-1和JAM mRNA表达明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:**参苓白术散抗DSS诱导的IBD的作用与调节肠上皮细胞间细胞紧密连接有关。

**[关键词]** 参苓白术散; 炎症性肠病; 紧密连接; 咬合蛋白; 闭合蛋白; 胞浆附着蛋白; 细胞间连接黏附分子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0130-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030130

**Effect of Shenling Baizhu San on Regulation of Tight Junction in DSS-induced IBD Mice** LIU Yu-hui<sup>1</sup>, HU Jie<sup>1</sup>, YI Wen-feng<sup>1</sup>, YOU Yu<sup>2\*</sup> (1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. The Digestive Department of First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of Shenling Baizhu San (SLBZS) in treating dextra sulfate sodium (DSS)-induced inflammatory bowel disease (IBD) mice. **Method:** Eighty SPF BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, positive group, low-, medium- and high-dose SLBZS groups. The IBD mice were fed 5% DSS in their drinking water for 7 days, and control mice received only water. The mice in SLBZS groups were given SLBZS at doses of 3, 6, 12 g·kg<sup>-1</sup>, the mice in positive group were given mesalazine sustained release granules at dose of 2 g·kg<sup>-1</sup>, and the control mice were given the same volume of normal saline by intragastric administration. The mice weight, stool occult blood in the stool, the calculation of disease activity (DAI), pathological examination of intestinal mucosal lesions integral were observed after 15 days. The expression of Claudin protein was tested by Western bolt. The expression of Occluding, Claudin, ZO-1 and JAM mRNA were analyzed by RT-PCR. **Result:** The lesion was obvious, Claudin protein decreased obviously in the model group as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Claudin protein, Occluding, Claudin, ZO-1 and JAM mRNA increased in DSS and all doses SLBZS groups as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** SLBZS has good effect in DSS-induced IBD mice by the regulation of intestinal epithelial cell tight junctions.

**[Key words]** Senling Baizhu San; inflammatory bowel disease; tight junction; Occluding; Claudin; ZO-1; JAM

**[收稿日期]** 20140604(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160540/H2814)

**[第一作者]** 刘玉晖,博士,副教授,从事中药药理学研究,Tel:0791-87118919,E-mail:liuyuhui77@126.com

**[通讯作者]** \*游宇,博士,从事肠道疾病的治疗以及机制研究,Tel:0791-88692505,E-mail:youyu1979@126

溃疡性结肠炎是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 在中医学中没有与之完全对应的病名, 据其临床特点, 归属于“痢疾”、“泄泻”、“肠癖”、“下痢”等范畴。参苓白术散功效为益气健脾, 渗湿止泻<sup>[1]</sup>。动物实验说明参苓白术散加减可以有效的增加结肠炎小鼠表皮生长因子 (EGF) 的表达, 具有保护肠上皮免疫屏障的作用<sup>[2]</sup>, 课题组前期的动物实验也证实参苓白术散可通过抑制氧化应激及随后触发的炎症反应而起到抗 IBD 的作用<sup>[3]</sup>。

肠上皮细胞间连接蛋白主要有 ZO-1, 咬合蛋白 (Occluding), 闭合蛋白 (Claudin), 连接相关分子 (JAM) 等, 正常情况下肠上皮细胞间连接复合体包括紧密连接 (tight junction)、缝隙连接 (gap junction) 等, 紧密连接对于维持肠上皮屏障功能有重要作用<sup>[4-5]</sup>。IBD 患者病变肠黏膜紧密连接蛋白的表达明显降低, 而其正常肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白表达与正常人群表达无差异, 说明上皮细胞紧密连接蛋白表达异常仅见于病变组织<sup>[6]</sup>; 基因敲除上皮细胞紧密连接蛋白的动物出生后会出类似 IBD 肠道病理改变<sup>[7]</sup>。本研究从动物实验入手, 利用前期动物实验中的肠道组织<sup>[3]</sup>进行进一步研究参苓白术散抗葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulphate, DSS) 诱导小鼠 IBD 作用与肠上皮细胞间紧密连接之间的关系。

## 1 材料

**1.1 动物** BALB/c 小鼠, SPF 级, 动物合格证号 SYXK(赣) 2010-0002, 雄性, 6~8 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 购于南昌大学医学院实验动物部, 饲养于清洁级动物房。

**1.2 药物及试剂** 葡聚糖硫酸钠 (德国 Fluka 公司, 批号 9011181), 参苓白术散 (云南白药集团股份有限公司, 批号 Z20044106), 柳氮磺胺吡啶 (上海爱的发制药公司, 批号 05872), RIPA 裂解液 (美国 Solarbio 公司, 批号 7BBO44), MSF (美国 Solarbio 公司, 批号 220c032), 十二烷基磺酸钠 (SDSNa)、过硫酸胺、聚丙烯酰胺 (美国 Amesco 公司, 批号 502B307), TEMED (美国 Sigma 公司, 批号 T8133), SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 ×, 北京全式金公司, 批号 GH101-1), 30% Acr-Bis (北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 批号 39R00141), BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒, 美国赛默飞世尔科技公司, 批号 MD158290), 20% 聚山梨酯 20 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 7BB044), 过硫酸胺 (美国 Solarbio 公司, 批号 427A033), β-actin 抗体 (武汉博

士德生物工程有限公司, 批号 12320), Claudin5 抗体 (英国 Affinity 公司, 批号 AF0130), Goat Anti-rabbit IgG (北京全式金公司, 批号 I10318), Goat Anti-mouse IgG (北京全式金公司, 批号 I20303), TRIzol Reagent (北京全式金公司, 批号 H20801), DNA Marker I (北京全式金公司, 批号 G10525ERK), 琼脂糖 (Agarose, 美国 Promega 公司, 批号 0000208922), EasyScript™ Two-Step RT-PCR SuperMix 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, 批号 H31203)。

**1.3 仪器** Gel Doc 2000 型分子成像仪 (美国 Bio-Rad 公司), PowerPac™ Basic 型电泳电源 (美国 Bio-Rad 公司), PowerPac™ Basic 型 DNA 琼脂糖凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), PowerPac™ Basic 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司), Allegra™ MX-12R 型高速冷冻离心机 (美国 Beckman Coulter 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** 动物分为正常组、模型组、柳氮磺胺吡啶组、参苓白术散低、中、高剂量组 6 组, 每组 8 只。模型组、柳氮磺胺吡啶组 (2 g·kg<sup>-1</sup>)、参苓白术散高、中、低剂量组 (12, 6, 3 g·kg<sup>-1</sup>) 的急性溃疡性结肠炎模型由小鼠自由饮用 5% DSS 7 d 造成, 每日观察粪便性状及粪便隐血情况及一般情况, 如进食、饮水、活动等。连续给予相应药物 ig 15 d。

**2.2 蛋白提取** 取出 -80 °C 冰箱的血管组织, 放入研钵中, 液氮研碎; 加 Western 及 IP 细胞裂解液及 PMSF 配制液, 继续研磨, 至组织样品完全裂解 30 min 后, 即可将裂解液移至 1.5 mL 离心管中置于离心机中 10 000 ~ 14 000 × g 离心 3 ~ 5 min, 取上清, 分装保存于 -80 °C 冰箱。

**2.3 Western blotting 检测 Claudin 蛋白表达** 按上样量计算后, 加入 5 × 上样缓冲液, 混匀, 煮沸 5 min。取变性后的总蛋白, 上样, 电泳 (调浓缩胶时, 恒压电泳 40 V, 观察进入分离胶后为 80 V, 至条带跑到底部)、转膜 (将转膜液倒入电泳池, 200 mA 恒流, 根据蛋白相对分子质量大小设置转膜时间)、用含 5% 脱脂奶粉的封闭液在摇床上 4 °C 封闭 30 min, 先后加入对应稀释倍数的一抗, 摇床 4 °C 过夜, 次日, 用 TBST 清洗 3 遍, 孵育相应稀释后的二抗, 摇床 4 °C 4 h, TBST 清洗 3 遍, 免疫印迹化学发光剂, 于暗室中胶片曝光和显影。

**2.4 组织中总 RNA 提取** BALB/c 小鼠小肠总 RNA 提取按照全式金 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒方法操作。逆转录 cDNA 合成, 42 °C 孵育 30 min,

85 °C 加热失活 Easy Script RT, -20 °C 保存。

**2.5 RT-PCR 检测 Occluding, Claudin, ZO-1 和 JAM 基因表达** GAPDH 上游引物 5'-CACCACCATGGAGAAGGCTGG-3', 下游引物 5'-GGCAGTGATGGCATGGACTGTG-3', 退火温度 60 °C; Occluding 上游引物 5'-GCCGAAGAGGTTGACAGTCC-3', 下游引物 5'-ACTCCCCACCTGTCGTGTAG-3', 退火温度为 58 °C; JAM 上游引物 5'-TCCTGGAGAATGTGTTT GGA-3', 下游引物 5'-GCATCTCTTGGGAAGGAGAG-3', 退火温度为 56 °C; ZO-1 上游引物 5'-CCATCTTTGGACCGATTGCTG-3', 下游引物 5'-TAATGCCCGAGCTCCGATG-3', 退火温度为 60 °C。Claudin 上游引物 5'-GCCACAACATCATCACAGCC-3', 下游引物 5'-CCTTGGAGGAATTGGACTTGG-3', 退火温度为 55 °C。扩增反应体系体积为 25 μL, 扩增完后, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (含 EB), DNA marker 每孔加样 5 μL, 电泳完成后, 取出凝胶, 于暗箱式紫外线透射仪下观察, 可见到 EB 染色后的特异性条带。将凝胶置于凝胶成像分析系统照相保存, 用 Imagemaster VDS 图像分析软件测定条带的积分吸光度 (IA)。以 GAPDH 为内对照, Claudin, JAM, Occluding, ZO-1 mRNA 表达量进行半定量分析。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件分析数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 总体比较采用 One-Way ANOVA, 组间比较采用 LSD, 多重比较 *t* 检验分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

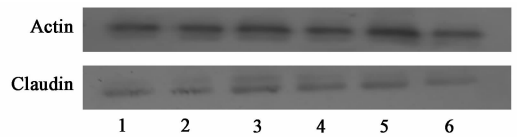
**3.1 对各组小鼠结肠组织中 Claudin 蛋白表达的影响** 与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织中 Claudin 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 不同剂量的参苓白术散组以及柳氮磺胺吡啶组均可以不同程度的升高 Claudin 蛋白的水平 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 1。

表 1 参苓白术散对小鼠结肠组织中 Claudin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effects of SLBZS on Claudin protein levels of intestines of BALB/c mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Claudin/ $\beta$ -actin
正常	-	0.075 ± 0.002
模型	-	0.063 ± 0.007 <sup>1)</sup>
柳氮磺胺吡啶	2	0.076 ± 0.008 <sup>2)</sup>
参苓白术散	3	0.069 ± 0.006 <sup>2)</sup>
	6	0.100 ± 0.010 <sup>2)</sup>
	12	0.075 ± 0.008 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 同)。



1. 正常组; 2. 模型组; 3. 柳氮磺胺吡啶 2 g·kg<sup>-1</sup> 组; 4. 参苓白术散 3 g·kg<sup>-1</sup> 组; 5. 参苓白术散 6 g·kg<sup>-1</sup> 组; 6. 参苓白术散 12 g·kg<sup>-1</sup> 组 (图 2 同)

图 1 小鼠肠组织 Claudin 蛋白表达水平

Fig. 1 Expressions of Claudin protein level in intestinal tissue

**3.2 对小鼠结肠组织中 Occluding, Claudin, ZO-1 和 JAM mRNA 表达的影响** 与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织中 Occluding, Claudin, ZO-1 和 JAM mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 与模型组比较, 不同剂量的参苓白术散组及柳氮磺胺吡啶组均可以不同程度的升高 Occluding, Claudin, ZO-1 和 JAM mRNA 的水平 ( $P < 0.05$ )。见图 2, 表 2。

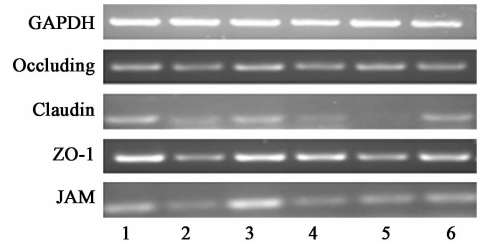


图 2 小鼠 IBD 肠组织 Occluding, Claudin, ZO-1 与 JAM mRNA 水平

Fig. 2 Expressions of Occluding, Claudin, ZO-1 and JAM mRNA level in intestinal tissue

### 4 讨论

肠上皮细胞间的连接, 从顶端到基膜依次为紧密连接、黏附连接、桥粒和缝隙连接等, 其中以肠上皮细胞间的紧密连接 (tight junction, TJ) 最为重要, TJ 由紧密连接蛋白所构成, 这些蛋白主要包括 Occluding, Claudin, JAM 等跨膜蛋白和 ZO, 丝状肌动蛋白等 30 多种胞内蛋白<sup>[4-5]</sup>。目前普遍认为, 肠上皮 TJ 一旦发生变异、减少或缺失, 肠上皮细胞间隙通透性就会增加, 细菌、内毒素及大分子物质可通过紧密连接进入体循环, 而这一系列的病理过程容易导致肠黏膜屏障功能异常参与了 IBD 的发病<sup>[8]</sup>。

DSS 诱导的 IBD 模型中发现, 由于 DSS 引起的氧化应激反应以及 ROS 含量的升高, 导致了丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、细胞外信号调节激酶 (ERK) 以及 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[9]</sup>。促炎症因子能够直接抑制上皮细胞紧密连接蛋白 Occluding, Claudin, JAM, ZO 等的蛋白表达或者磷酸化程度, 从而引起

表 2 参苓白术散对小鼠结肠组织中 Occludin, Claudin, ZO-1 和 JAM mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effects of SLBZS on Occludin, Claudin, ZO-1 and JAM mRNA levels of intestines of BALB/c mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Occludin	Claudin	ZO-1	JAM
正常	-	0.74 ± 0.01	0.44 ± 0.02	1.15 ± 0.05	0.71 ± 0.005
模型	-	0.58 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.48 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.59 ± 0.07 <sup>1)</sup>
柳氮磺胺吡啶	2	1.00 ± 0.09 <sup>2)</sup>	0.64 ± 0.06 <sup>2)</sup>	1.18 ± 0.15 <sup>2)</sup>	1.69 ± 0.21 <sup>2)</sup>
参苓白术散	3	0.73 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.29 ± 0.03	1.15 ± 0.18 <sup>2)</sup>	0.45 ± 0.12
	6	0.74 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.61 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.72 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	12	0.68 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.90 ± 0.10 <sup>2)</sup>	0.79 ± 0.08 <sup>2)</sup>

TJ 的断裂<sup>[10-11]</sup>。本课题拟研究《太平惠民和剂局方》所记载的参苓白术散(莲子、薏苡仁、砂仁、桔梗、白扁豆、茯苓、人参、炙甘草、白术、山药)对炎症性肠病的防治作用以及机制。课题组前期的动物实验证实参苓白术散通过抑制氧化应激及随后触发的炎症反应、抑制 ERK/p38MAPK 信号通路活化作用而起到抗 IBD 的作用<sup>[3]</sup>。

综上所述,本实验研究发现,DSS 导致的 IBD 模型组小鼠的肠道组织中 Claudin 蛋白, Claudin, Occludin, JAM 和 ZO-1 mRNA 的表达明显低于正常组,而参苓白术散组的 Claudin 蛋白, Claudin, Occludin, JAM 和 ZO-1 mRNA 的表达与 IBD 模型组比较有不同程度的升高,与柳氮磺胺吡啶组效果相似,表明参苓白术散对由 DSS 造成 IBD 有一定的改善作用且与肠上皮细胞紧密连接密切相关。

[参考文献]

[ 1 ] 田德禄,田海河.慢性非特异性溃疡性结肠炎中医研究述评[J].北京中医药大学学报,1994,17(4):2-6.  
[ 2 ] Sparrow M P, Hande S A, Friedman S, et al. Effect of allopurinol on clinical outcomes in inflammatory bowel disease nonresponders to azathioprine or 6-mercaptopurine[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5 (2):209-216.  
[ 3 ] 游宇,刘玉晖,高书亮.参苓白术散抗小鼠炎症性肠病的机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18 (5):136-139.

[ 4 ] Arrieta M C, Bistritz L, Meddings J B. Alterations in intestinal permeability [ J ]. Gut, 2006, 55 ( 10 ): 1512-1520.  
[ 5 ] Turner J R. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application [ J ]. Am J Pathol, 2006, 169 ( 6 ): 1901-1918.  
[ 6 ] Gassler N, Rohr C, Schneider A, et al. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions [ J ]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281 ( 1 ): G216-G218.  
[ 7 ] Hermiston M L, Gordon J I. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin [ J ]. Science, 1995, 270 ( 5239 ): 1203-1207.  
[ 8 ] Xavier R J, Podol Sky D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease [ J ]. Nature, 2007, 448 ( 26 ): 427-434.  
[ 9 ] Bhattacharyya S, Dudeja P K, Tobacman J K. ROS, Hsp27, and Kappa Kbeta mediate dextran sodium sulfate (DSS) activation of IkappaBa, NFkappaB, and IL-8 [ J ]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15 ( 5 ): 673-683.  
[ 10 ] Liu Z, Zhang P, Ma Y, et al. Lactobacillus plantarum prevents the development of colitis in IL-10-deficient mouse by reducing the intestinal permeability [ J ]. Mol Biol Rep, 2011, 38 ( 2 ): 1353-1361.  
[ 11 ] Naresh R, Song Y, Hampson D J. The intestinal spirochete Brachyspira pilosicoli attaches to cultured Caco-2 cells and induces pathological changes [ J ]. PLoS One, 2009, 4 ( 12 ): e8352.

[责任编辑 周冰冰]