

藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达的影响

薛晓倩¹, 黄学宽^{1*}, 高宁², 刘鄂湖², 任凌燕³

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; 2. 第三军医大学生药学教研室, 重庆 400038;
3. 重庆科技学院化学化工学院, 重庆 401331)

[摘要] 目的: 研究藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜紧密连接蛋白(ZO-1)表达的影响。方法: 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、藿香正气液组, 每组 8 只。正常组常规喂养, 其余各组采用改进的环境加疲劳法制造湿阻证模型, 连续造模 6 d。造模成功后正常组和模型组予生理盐水 ig(20 mL·kg⁻¹), 治疗组予藿香正气液 ig(20 mL·kg⁻¹), 1 次/d, 连续 8 d。采用 RT-PCR 方法观察回肠黏膜 ZO-1 的表达情况。结果: 与正常组相比, 模型组大鼠脾虚症状明显, 胃肠黏膜有明显充血水肿, 且胃黏膜有明显出血点及血块, 且回肠黏膜 ZO-1 表达减少($P < 0.01$), 而藿香正气液组表达增加($P < 0.01$)。结论: 藿香正气液可明显改善湿阻证大鼠脾虚腹泻等症状, 其机制可能与提高回肠黏膜 ZO-1 的表达量有关。

[关键词] 藿香正气液; 湿阻证; 回肠黏膜; 紧密连接蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0224-04

Effects of Huoxiang Zhengqi Liquid on Expression of ZO-1 in Ileum Mucosa of Rats with Dampness Retention Syndrome

XUE Xiao-qian¹, HUANG Xue-kuang^{1*}, GAO Ning², LIU E-hu², REN Ling-yan³

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China;
2. Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Third Military Medical University,
Chongqing 400038, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering,
Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Huoxiang Zhengqi Liquid on expression of Zounlaoccludens-1(ZO-1) in ileum mucosa of rats with dampness retention syndrome(DRS). **Method:** Twenty four SD rats were randomly divided into 3 groups: control, DRS group and treatment groups (DRS + Huoxiang Zhengqi Liquid), 8 rats in each group. DRS was induced in all rats, except the control group, by modified enviromental and fatigued method for 6 days. After DRS model was formed, control and DRS groups were lavaged with normal saline (20 mL·kg⁻¹). Rats in treatment groups were lavaged with Huoxiang Zhengqi Liquid(20 mL·kg⁻¹) for 8 days. Then expression of ZO-1 on ileum mucosa was determined by Real-Time PCR. **Result:** Rats of model group exhibited typical DRS, with sign of hyperaemia, edema, hemorrhagic spots and sludged blood in the gastric mucosa was compared to control. The expression of ZO-1 on ileum mucosa significantly decreased in DRS group compared to that of control group ($P < 0.01$). Conversely, exposure of DRS rats to Huoxiang Zhengqi Liquid resulted in increase in expression in ZO-1 in the ileum mucosa ($P < 0.01$ versus DRS group). **Conclusion:** Huoxiang Zhengqi Liquid could have the protective effect on DRS-induced gastric mucosal injury, and increasing in expression of ZO-1 may play an important role.

[收稿日期] 2011-05-11

[基金项目] 重庆市卫生局科技项目(2009-02-114)

[第一作者] 薛晓倩, 在读硕士, 从事脾胃理论研究, Tel: 15310300403, E-mail: a8635389@163.com

[通讯作者] * 黄学宽, 副教授, 硕士生导师, 从事脾胃理论研究和临床, Tel: 13452382058, E-mail: xkhuang2002@163.com

[Key words] Huoxiang Zhengqi liquid; dampness retention syndrome; ileum mucosa; ZO-1

湿阻证为临床常见脾胃病证候之一,是指湿邪阻滞中焦,以全身困重倦怠、胸脘痞闷、腹胀纳呆、口黏苔腻为主要临床表现的病症^[1]。ZO-1 (zonulaoccludens-1)是1986年发现的构成紧密连接的重要成分之一,属于膜相关鸟苷酸激酶 MAGUK 家族,参与屏障作用的信号转导、细胞增殖与分化、免疫调节等,并与癌细胞转移、上皮细胞极性形成有关^[2]。藿香正气方剂源于宋代《太平惠民和剂局方》,具有解表化湿、理气和中等作用,主治外感风寒、内伤湿滞诸证。经长期实践证实其对改善胃肠道多种症状疗效显著^[3]。随着其剂型的变化,其在临床中运用十分广泛,但目前对其作用机制的研究较少,本课题拟观察藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜 ZO-1 的影响,以期进一步了解其改善胃肠道症状的可能机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(200±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,生产许可证号 SCXK(渝)2007-0001。

1.2 药品与试剂 藿香正气液(太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,批号 09050567),乌来糖(国药集团化学试剂有限公司),异丙醇(重庆川东化工公司),RNA 提取试剂盒(批号 D9108A),逆转录试剂盒(批号 DRR037S),Real-timePCR 试剂盒(批号 DRR081A)。

1.3 仪器 梯度 PCR 仪(Bio-Rad),荧光定量 PCR 仪(iQTM5,BIO-RAD),冷冻离心机(Thermo)等。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 将24只SD大鼠适应性喂养1周后,随机分为正常组、模型组、藿香正气液组,每组8只。正常组常规喂养,其余2组采用改进的环境加疲劳法进行造模:实验室温度(28±2)℃,将大鼠放入水深25cm、水温(26±1)℃的水池中游泳15min,游毕取出,立即给予4℃蒸馏水ig,体积为20mL·kg⁻¹,然后将动物置于笼底盛有4mm水深的饲养笼中饲养,自由进食与饮水。上述操作1次/d,连续6d,末次造模后换入正常环境中饲养。造模期间,注意观察造模大鼠的精神状态、活动、大便、进食及体重情况,造模成功后,从第7天开始,正常组和模型组予生理盐水(20mL·kg⁻¹),治疗组予

藿香正气液ig(20mL·kg⁻¹),1次/d,连续8d ig^[4]。

2.2 指标检测 末次给药后禁食不禁水12h,脱颈椎处死大鼠后开腹摘取全胃,沿胃小弯剪开,4℃生理盐水清洗胃内容物,肉眼观察胃黏膜情况。找到回肠后剪取长为4cm的回肠段,用生理盐水冲洗肠内容物,置于EP管中并剪碎,置-80℃冰箱保存。

2.2.1 Real-Time PCR

2.2.1.1 cDNA 的获取及引物的设计合成 参照试剂盒说明进行总RNA提取。引物设计及合成由生物工程(上海)有限公司完成:ZO-1上游引物:5'-CACCCACTCTTCCAGAACCAA-3',下游引物:5'-TTCCGACATCATTTCCACCAG-3',内参β-actin上游引物:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游引物:5'-CCATACCCACCATCACACC-3'。

2.2.1.2 逆转录反应 取2μL RNA模板做逆转录反应,反应体系如下:5×PrimeScript Buffer 2μL, PrimeScript RT Enzyme Mix ×1 0.5μL, Oligo dT Primer 0.5μL, Random 6mers 0.5μL, Rnase Free dH₂O 4.5μL。总体积为10μL。反应条件:37℃ 15min,然后85℃ 5s。

2.2.1.3 RT-PCR 反应 比较两基因扩增效率:选取cDNA样品模板进行10倍梯度稀释,ZO-1及β-actin分别进行RT-PCR反应,仪器自动显示ZO-1和β-actin的实时荧光曲线,通过cDNA浓度梯度的log值对ΔCT值作图比较两基因扩增效率。

反应体系及条件:2种基因同管扩增,每个样品做3个平行复孔,取均值,反应体系:SYBR Premix × Ex TapTM II 12.5μL, PCR Forward Primer(10μmol·L⁻¹) 1μL, PCR Reverse Primer(10μmol·L⁻¹) 1μL, DNA模板 2μL, dH₂O 8.5μL。总体积为25μL。反应条件:95℃ 30s 重复:1次,95℃ 5s,60℃ 30s,重复40次,Dissoiation 60℃ 30s,重复71次。反应结束后由电脑自动得出荧光曲线及CT值。

2.3 统计学处理 样品设置相同的阈值,并设置好各自的扩增效率,采用2^{-ΔΔCT}法处理数据^[5]。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS统计软件,采用单因素方差分析,P<0.05差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察 与正常组比较,模型组大鼠出

现精神萎靡、活动减少、懒动、游泳坚持时间缩短、呛水时间较早、便溏、脱毛、食量及饮水量减少、体重下降等表现。而经藿香正气液治疗后,大鼠体重、饮食等一般情况均有明显改善,精神萎靡、倦怠乏力症状消失,活动增加,大便正常,且无脱毛等现象。

3.2 大鼠胃黏膜观察 造模后大鼠胃黏膜充血、水肿明显,有小出血点及凝血块;藿香正气液治疗后,大鼠胃黏膜损伤得到修复,无充血、水肿、出血及血凝块等表现。

3.3 两基因扩增效率比较 反应结束后,仪器自动

表 1 藿香正气液对大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	ZO-1 CT	β -actin CT	ΔCT	相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$
正常	-	24.952 ± 1.467 ¹⁾	22.324 ± 1.165 ¹⁾	2.628 ± 1.315 ¹⁾	1.000 ± 0.000 ¹⁾
模型	-	27.614 ± 2.185	21.086 ± 0.490	6.528 ± 2.006	0.039 ± 0.058
藿香正气液	20	26.251 ± 1.415 ¹⁾	22.060 ± 0.884 ¹⁾	4.191 ± 0.958 ¹⁾	0.339 ± 0.362 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医认为,湿与脾关系最为密切,《素问·至其要大论》说:“诸湿肿满皆属于脾”,可见湿邪致病每易伤脾,而脾失健运也易滋生内湿,阻滞中焦脾胃,发为泄泻、水肿、腹胀、饮食减少、神疲乏力、少气懒言等病症。现代研究证实,湿邪可引起一系列胃肠消化、吸收及运动功能障碍为主的综合症候群。而胃镜下可表现为黏膜充血、水肿、糜烂或伴有出血点等急性炎症改变,组织学特点则以淋巴细胞、浆细胞浸润为主^[5]。湿阻证的发病与气候、居住及工作环境密切相关,卫外不固时,均可导致湿邪从外入里。此外,饮食不节、饮酒和嗜茶过度以及情志不遂以及病原微生物等均与湿阻证的发生有密切关系^[6]。

肠黏膜屏障是肠道最重要的一道屏障,由肠上皮细胞及细胞间的连接构成,而紧密连接是上皮细胞间最重要的连接方式,位于上皮细胞间的顶端,其功能只允许离子及可溶的小分子物质通过,而不允许毒性大分子及微生物通过,该特殊生理功能对肠道黏膜屏障的维护起至关重要的作用^[7]。ZO-1 是 1986 年发现的构成紧密连接的重要成分之一,属于膜相关鸟苷酸激酶 MAGUK 家族,与其同源体 ZO-2, ZO-3 组成 ZO-1/ZO-2/ZO-3 复合体,为紧密连接的许多跨膜蛋白和细胞质搭建具有连接作用的脚手架平台及维持上皮细胞极性^[2],对各类影响屏障功能的刺激敏感,是显示紧密连接功能正常与否的重要标志,它通过肌丝将跨膜蛋白和细胞骨架系统连

显示 ZO-1 和 β -actin 的实时荧光曲线,通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对 ΔCT 值作图,得直线斜率为 0.073 (斜率绝对值 < 0.1), $R^2 = 0.063$,说明目的基因与内参基因扩增效率相同。

3.4 大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达情况 结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量。^[5] $2^{\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因的表达相对于内参基因表达的倍数。结果表明,模型组回肠黏膜 ZO-1 表达量降低 ($P < 0.01$),经过藿香正气液治疗后,回肠黏膜 ZO-1 表达增高 ($P < 0.01$) 见表 1。

接在一起^[8],构成稳定的连接系统。在人体的眼、大脑、膀胱、肾、肠道等组织中均有表达,且与许多肠道疾病如炎症性肠病^[9]、乳糜泻^[10]等密切相关。D Pizzuti 等^[8]通过研究肠道自身免疫性疾病患者小肠 ZO-1 的变化,发现沿着小肠绒毛轴边缘和隐窝区的细胞核间隔中 ZO-1 表达量降低。曹小玉等^[11]研究发现脾虚动物可以出现肠上皮细胞及细胞连接异常,导致消化吸收障碍、腹胀等症状,而四君子汤对此有治疗作用。研究表明,ZO-1 还参与免疫调节,与改善黏膜免疫功能相关^[2]。综上所述,当 ZO-1 分布、数量或结构发生改变时,均使肠黏膜屏障收到破坏,从而影响消化吸收功能及易发生各种感性疾病。而湿阻证所致的脾虚腹泻、纳差等消化系统症状可能与 ZO-1 的改变有关。

藿香正气由藿香、半夏曲、陈皮、白术、茯苓、大腹皮、厚朴、紫苏、白芷、桔梗、炙甘草组成。方中藿香芳香化浊、理气和中、解表散邪,紫苏、白芷解表散寒、化湿,厚朴、大腹皮理气化湿,陈皮、半夏理气降逆、和胃化湿,茯苓、白术益气健脾化湿,桔梗宣肺利咽,生姜解表散寒、温中止呕,大枣补中益气,甘草清热解毒、缓急止痛并调和诸药。诸药合用,共奏解表化湿、理气和中之功^[12],主治外感风寒、内伤湿滞诸证。藿香正气液是临床常用中成药,经长期实践证明其对改善胃肠道多种症状疗效显著。李忠鹏^[13]等用藿香正气胶囊治疗功能性消化不良患者 52 例,总有效率为 92.31%,赵丽娅^[14]等外用藿香正气软

胶囊治疗夏季婴幼儿腹泻,获得很好疗效,吕丹杨^[15]采用口服藿香正气软胶囊治疗肠易激综合征 58 例,总有效率为 89.7%,且治疗未发现有不适应者。相关动物实验提示藿香正气液能促进大鼠胃排空、推进肠蠕动且能提高血浆、胃窦及空肠组织匀浆中胃动素、P 物质水平,并降低血管活性肠肽的水平^[16,19]。以上表明该方在治疗胃肠疾病方面有较好疗效和应用前景。

本实验结果表明,藿香正气液治疗 8 d 后,大鼠湿阻脾虚症状明显改善,大鼠精神状态良好、体重及饮食均增加,胃黏膜充血、水肿消失,大鼠肠黏膜 ZO-1 表达升高。提示藿香正气液改善湿阻证大鼠纳差、腹泻及腹胀等消化道症状可能与提高肠黏膜 ZO-1 的表达量有关,但藿香正气液对湿阻证大鼠胃肠功能的影响机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘仁泉,姜莉萍. 湿阻证治心悟[J]. 光明中医,2009, 24(5):920.
- [2] 李秋霞,罗茂林,李茹柳,等. 紧密连接蛋白 ZO-1 研究概述[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(6):523.
- [3] 王巧兰. 藿香正气方剂药理作用与临床应用[J]. 海峡药学,2007,19(9):85.
- [4] 韩志刚,黄学宽,刘群英,等. 化湿液对湿阻证大鼠胃黏膜损伤修复的影响[J]. 中药材,2008, 31(12):1849.
- [5] 孔祥华,黄萍,吴清和,等. 湿阻中焦证研究进展[J]. 甘肃中医,2004,17(9):5.
- [6] 李连成. 湿阻的流行病学调查[J]. 中医杂志,1992,33(6):44.
- [7] 秦环龙,高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2005, 13(4):443.
- [8] Pizzuti D, Mazzon E, Guariso G, et al. Transcriptional downregulation of tight junction protein ZO-1 in active coeliac disease is reversed after a gluten-free diet[J]. Dig Liver Dis,2004,36(5):337.
- [9] Gassler N, Rohr C, Schneider A, et al. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junction[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001,281(1):216.
- [10] Deitch E A, Xu D, Naruhn M B, et al. Elemental diet and IV-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria[J]. Ann Surg,1995,221(3):299.
- [11] 曹小玉,杨智梅,彭成. 四君子颗粒抗脾虚动物胃肠细胞损伤的研究[J]. 成都中医药大学学报,2009,23(3):32.
- [12] 常立新,刘军. 口服藿香正气软胶囊加藿香正气液灌肠联合用药治疗结肠炎 153 例[J]. 中外医疗,2007, 11(22):20.
- [13] 李忠鹏,张红艳,吉岩忠. 藿香正气胶囊治疗功能性消化不良 98 例[J]. 武警医学,2006,17(3):234.
- [14] 赵丽娅,王艳丽. 藿香正气软胶囊敷脐治疗夏季婴幼儿腹泻[J]. 中国民间疗法,2005,13(6):17.
- [15] 吕丹杨. 藿香正气软胶囊治疗肠易激综合征 58 例临床观察[J]. 浙江中医杂志,2004(7):308.
- [16] 杨国汉,胡德耀,戴裕光,等. 藿香正气液及其组方药物对大鼠胃排空和肠推进作用的影响[J]. 实用中医药杂志,2005,21(9):521.
- [17] 杨国汉,胡德耀,戴裕光,等. 藿香正气液对大鼠胃动素的影响[J]. 第三军医大学学报,2006, 28(2):166.
- [18] 杨国汉,胡德耀,戴裕光,等. 藿香正气液对大鼠血管活性肠肽的影响[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(8):935.
- [19] 杨国汉,胡德耀,戴裕光,等. 藿香正气液对大鼠 P 物质的影响[J]. 中国药房,2005,16(13):982.

[责任编辑 何伟]