

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.16.012

清热化湿调枢方对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎模型小鼠肠黏膜屏障及相关蛋白表达的影响

苏晓兰¹, 姚梦茜^{1,2}, 陈琳¹, 张涛^{1,2}, 王琳^{1,2}, 卿香丽^{1,3}, 张格知^{1,2}, 魏玮¹✉

1. 中国中医科学院望京医院, 北京市朝阳区望京中环南路6号, 100102; 2. 中国中医科学院; 3. 成都中医药大学

[摘要] 目的 探讨清热化湿调枢方治疗溃疡性结肠炎的可能作用机制。方法 36只C57BL/6小鼠随机抽取6只小鼠为正常组, 其余小鼠均给予2.5%葡聚糖硫酸钠(DSS)水溶液自由饮用7天以制备DSS结肠炎小鼠模型。将造模成功小鼠再随机分为模型组, 美沙拉嗪组以及清热化湿调枢方低、中、高剂量组, 每组6只。正常组和模型组小鼠予0.5 ml纯水灌胃; 美沙拉嗪组小鼠给予0.52 g/(kg·d)美沙拉嗪混悬液灌胃; 清热化湿调枢方低、中、高剂量组小鼠分别给予清热化湿调枢方0.845、1.690、3.380 g/(kg·d)灌胃; 各组均每日1次, 连续10天。干预后测量各组小鼠体质量并进行疾病活动指数(DAI)评分, 测量结肠长度并观察结肠组织病理变化, 检测结肠组织黏蛋白2(MUC-2)阳性表达及带状闭合蛋白1(ZO-1)、闭合蛋白1(Claudin-1)、咬合蛋白(Occludin)表达。结果 与正常组相比, 模型组和清热化湿调枢方低剂量组小鼠的体质量下降, DAI评分明显升高, 结肠长度变短, 结肠组织ZO-1、Occludin、Claudin-1蛋白表达均降低($P<0.05$)。与模型组和清热化湿调枢方低剂量组比较, 美沙拉嗪组和清热化湿调枢方高、中剂量组小鼠体质量增加, DAI评分下降, 结肠长度增长, 结肠组织ZO-1、Claudin-1、Occludin蛋白表达升高($P<0.05$)。正常组小鼠肠黏膜上皮完整, 无炎性细胞浸润; 模型组小鼠肠黏膜上皮缺损, 杯状细胞明显减少, 固有层及隐窝结构破坏严重, 排列紊乱, 并可见大量淋巴细胞浸润; 清热化湿调枢方高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠黏膜上皮几乎无缺损, 极少炎性细胞浸润; 而清热化湿调枢方中、低剂量组改善不明显。正常组MUC-2表达为棕黄色颗粒, 广泛分布在杯状细胞胞浆(核周及核膜); 模型组小鼠结肠组织中MUC-2阳性表达明显减少; 美沙拉嗪组和清热化湿调枢方高、中剂量组MUC-2阳性表达较模型组有较明显的恢复。结论 高、中剂量清热化湿调枢方对DSS结肠炎小鼠的肠道黏膜屏障损伤具有一定修复作用, 其作用机制可能是增加结肠组织MUC-2表达, 促进ZO-1、Occludin、Claudin-1分泌, 从而促进黏膜化学及机械屏障的修复, 维持肠黏膜屏障的稳态。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 清热化湿调枢方; 结肠组织; 肠黏膜屏障; 黏蛋白; 紧密连接蛋白

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)通常被认为是拥有易感基因的人群在环境、肠道菌群、饮食等多因素的共同及相互作用下引起肠道黏膜免疫屏障功能失常的肠道炎症性疾病^[1]。病变部位大多累及结肠, 组织损伤多局限在黏膜层及黏膜下层, 具有反复发作、迁延难愈的特点, 极大影响了患者的生活质量^[2]。近年来研究^[3-4]发现, UC的

发病通常为肠道黏膜屏障功能减弱, 致病菌以及毒素等更加容易通过从而诱导局部免疫反应, 引发肠道炎症。因此保护肠道黏膜屏障, 提高UC患者黏膜修复质量是减少UC复发关键所在。黏蛋白2(MUC-2)^[5]是构成结肠化学屏障中最主要的黏蛋白之一, 紧密连接(tight junction, TJ)是肠黏膜细胞间连接的一个重要形式, 由带状闭合蛋白(ZOs)、闭合蛋白(Claudins)、咬合蛋白(Occludin)、连接黏附分子(JAM)等共同组成, 是构成肠黏膜机械屏障最重要的结构^[6-8]。清热化湿调枢方是由国医大师路志正教授治疗UC经验方乌梅败

基金项目: 国家自然科学基金(81973638); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-035); 国家重大疑难疾病中西医结合临床协作能力建设项目

✉ 通讯作者: sxxtty@sina.com

酱方加儿茶、秦皮而成,具有清热化湿、健脾调枢之功效。既往研究显示,乌梅败酱方治疗 UC 有很好的疗效^[9-10]。葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的小鼠结肠炎模型的肠道病变与人类病理形态最为近似,是较为理想的 UC 模型^[11]。本研究将从肠道黏膜屏障角度探讨清热化湿调枢方对 DSS 诱导的结肠炎小鼠肠黏膜屏障的作用及可能机制。本研究通过中国中医科学院针灸研究所伦理委员会伦理审查,批件号:中科针伦(D2021-03-16-2)。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠 36 只,8 周龄,体质量为(20±2)g,购于北京斯贝福生物技术有限公司,实验动物许可证号为 SCXK(京)2015-0015。将小鼠饲养于中国中医科学院针灸研究所 SPF 级动物房中,室温(24±2)℃、相对湿度 35%~45%,12 h 光照和黑暗交替,自由进食进水。

1.2 药物

清热化湿调枢方组成:乌梅 12 g,败酱草 12 g,黄连 6 g,当归 10 g,炒白芍 12 g,木香 9 g,枳实 10 g,葛根 12 g,麸炒白术 10 g,太子参 12 g,茯苓 15 g,秦皮 12 g,儿茶 6 g,甘草 9 g。配方颗粒购自四川新绿色药业,1 剂生药折合成药煎颗粒为 13 g,用蒸馏水配至所需高剂量浓度,清热化湿调枢方高剂量浓度 2 倍及 4 倍稀释,即可得到相应的中、低剂量浓度混悬液,4℃保存备用。葡聚糖硫酸钠(43 kDa,美国 MP Biomedicals 公司,批号 160110),用 100 ml 纯水溶解 2.5 g DSS 配成 2.5% 的 DSS 溶液。美沙拉嗪肠溶片(0.5 g/片,Losan-Pharmma GmbH 公司,进口药品注册证号为 H20171358),每天干预前取 0.5 g 刮去外部黄色药衣,于 50 ml 热水中充分溶解,配制成美沙拉嗪混悬液。

1.3 主要试剂与仪器

MUC-2 单克隆抗体(货号:PAA705Mu01)、抗 Occludin 抗体(货号:PAC228Mu01)、抗原修复液(货号:C1010)、PBS 缓冲液(货号:C1003)、苏木精染液(货号:C1001)、二抗(货号:PAE001)、DAB 显色剂(货号:C1101),武汉云克隆科技股份有限公司;抗闭合蛋白 1(Claudin-1)抗体(货号:ab15098)、抗带状闭合蛋白 1(ZO-1)抗体(货号:ab96587),Abcam 公司;水合氯醛(上海

士锋生物科技有限公司,批号:EB05980);中性组织固定液(上海源叶生物科技有限公司,批号:R20486);HE 染色液(北京赛因坦科技有限公司,批号:H8070);BSA(Solarbio 公司,货号:A8020)。

电泳仪(型号:DYY-6D)、电泳槽(型号:DYCZ-24DN),北京六一仪器厂;其林贝尔水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-1);转印槽(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY-ZY5);X 胶片观片灯(北京雅迪莱特医疗科技有限公司,型号:GPD-II);扫描仪(佳能公司,型号:5600F);高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,型号:HC-3018R);超声细胞破碎机(上海利闻科学仪器有限公司,型号:650Y);紫外分光光度计(日本岛津公司,型号:UV1800);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12J);包埋机(型号:KD-BM)、病理切片机(型号:KD-2258)、冻台(型号:KD-BL)、组织摊片机(型号:KD-P),浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;正置光学显微镜(日本奥林巴斯公司,型号:CK31)。

2 方法

2.1 分组与造模

36 只小鼠适应性喂养 1 周后,标号并称重,根据体质量采用 Excel 2016 中的 Rand 函数随机选取 6 只作为正常组,其余小鼠则参照 Wirtz 等^[12]造模方法给予 2.5% DSS 水溶液自由饮用 7 天,进行 DSS 结肠炎小鼠模型复制,正常组小鼠自由饮水。造模结束后,根据疾病活动指数(DAI)评分对模型进行评价,DAI 评分>1 分为造模成功^[13]。30 只小鼠均造模成功,将其再采用 Excel 2016 中的 Rand 函数随机分为模型组,美沙拉嗪组及清热化湿调枢方低、中、高剂量组,每组 6 只。

2.2 干预方法

参照《中药药理研究方法学》^[14],按实验小鼠与人体表面积比等效剂量换算比率,把人每天剂量折算成的小鼠等效剂量作为中剂量组给药剂量。从造模结束当天即干预第 1 天开始,清热化湿调枢方低、中、高剂量组的小鼠分别给予清热化湿调枢方 0.845、1.690、3.380 g/(kg·d)灌胃,美沙拉嗪组给予美沙拉嗪混悬液 0.52 g/(kg·d)灌胃,正常组和模型组给予 0.5 ml 纯水灌胃,每日 1 次,连续 10 天。

2.3 观察指标与方法

2.3.1 一般情况 每天观察并记录各组小鼠精神状态、一般活动情况、皮毛色泽、大便性状、肉眼血便或大便潜血、体质量等一般情况的变化。

2.3.2 DAI 评分 干预结束后,参考文献[13]对体质量下降情况、大便性状及潜血情况分别计分,计算各组小鼠 DAI 评分评价疾病活动情况。DAI 评分=(体质量下降分数+大便性状分数+潜血分数)/3。

2.3.3 结肠长度及结肠组织病理形态学观察 药物干预结束后第二日使用 10% 水合氯醛腹腔注射(0.3 ml/100 g)麻醉小鼠,将小鼠处死并分离结肠,测量小鼠结肠长度。然后取远端结肠约 1 cm 的长度,用 10% 中性甲醛固定后,石蜡包埋,切片,用 HE 染色,光镜下观察小鼠结肠切片组织学变化。

2.3.4 免疫组化检测结肠组织 MUC-2 蛋白表达 组织切片常规脱蜡至水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,5% BSA 封闭组织,随后再加入 1:1500 稀释的一抗,湿盒内孵育过夜,后滴加二抗室温孵育 50 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min, DAB 显色,随后苏木精复染,脱水封片,显微镜观察,采集图像,出现棕黄色颗粒为阳性表达。

2.3.5 Western blot 法检测结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达 结肠组织剪碎,收集蛋白样品,测定浓度。加入适量浓缩的 SDS-PAGE 蛋白上清缓冲液进行电泳及转膜。转膜结束后,将 PVDF 膜室温封闭 1 h 并用 PBST 冲洗。1:500 稀释一抗,一抗孵育,在室温水平摇床上缓慢摇动 1 h, PBST 冲洗 3 次;二抗孵育,重复上述操作。采用化学发光检测系统,将 PVDF 膜加入化学发光底物,后将其置入增光屏的暗盒中曝光,扫描图片显影、定影。以 GAPDH 单抗检测作为内参对照,采用 ImageJ V1.8.0.112 对目的蛋白条带灰度值进行分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,本研究计量资料均符合正态分布用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况

正常组小鼠状态良好、一般活动正常、毛色黑亮,正常进食、饮水。模型组小鼠造模第 3~5 天,部分小鼠的粪便潜血阳性,造模结束时,大部分小鼠腹泻,出现肉眼可见的血便,可明显看到活动迟缓,精神萎靡不振,喜蜷缩呈弓背状,无肉眼血便小鼠的粪便潜血阳性。与模型组比较,美沙拉嗪组及清热化湿调枢方高、中剂量组小鼠上述精神状态、毛发色泽及形态活动等方面均有所恢复,大便稀软以及便血情况好转;清热化湿调枢方低剂量组小鼠活动迟缓、精神萎靡不振、喜蜷缩呈弓背状、腹泻、肉眼血便或便潜血等一般情况改善不明显。

3.2 各组小鼠体质量、DAI 评分及结肠长度比较

表 1 示,与正常组相比,模型组和清热化湿调枢方低剂量组小鼠的体质量下降,DAI 评分明显升高,结肠长度变短($P<0.05$)。与模型组和清热化湿调枢方低剂量组比较,美沙拉嗪组和清热化湿调枢方高、中剂量组小鼠体质量增加,DAI 评分下降,结肠长度增长($P<0.05$),且美沙拉嗪组和清热化湿调枢方高、中剂量组组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.3 各组小鼠结肠组织病理形态学比较

图 1 示,正常组小鼠肠黏膜上皮完整,杯状细胞数目较多,固有层可见排列整齐、完整的隐窝结构,无炎性细胞浸润。模型组小鼠肠黏膜上皮缺损,杯状细胞明显减少,固有层及隐窝结构破坏严重,排列紊乱,并可见大量淋巴细胞浸润。清热化湿调枢方低剂量组小鼠结肠组织中仍可见多处黏膜

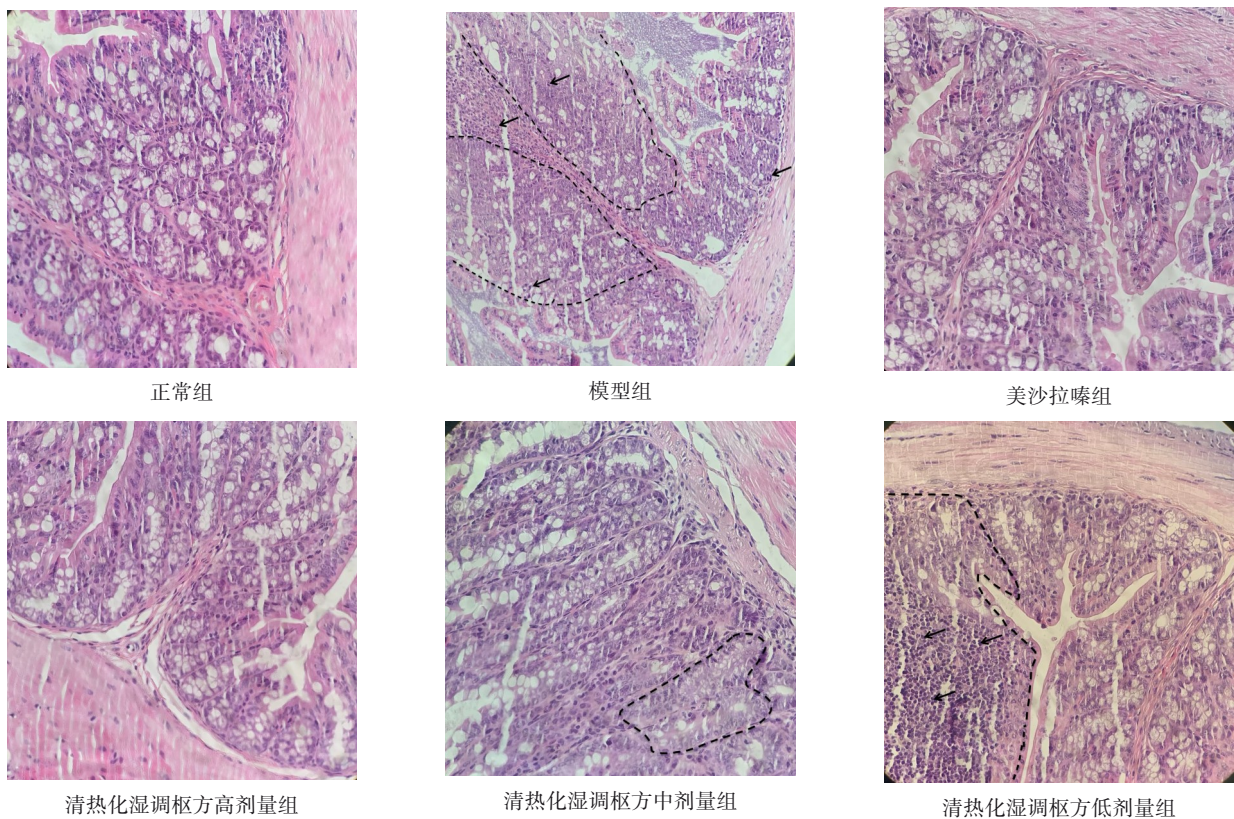
表 1 各组小鼠体质量、DAI 评分及结肠长度比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量/g	DAI 评分/分	结肠长度/cm
正常组	6	26.45±1.23	0	6.87±0.12
模型组	6	22.28±1.09 ^{a)}	1.78±0.27 ^{a)}	5.37±0.62 ^{a)}
美沙拉嗪组	6	25.40±1.96 ^{b) c)}	0.44±0.54 ^{b) c)}	6.77±0.68 ^{b) c)}
清热化湿调枢方高剂量组	6	25.85±1.07 ^{b) c)}	0.39±0.53 ^{b) c)}	6.62±0.73 ^{b) c)}
清热化湿调枢方中剂量组	6	25.42±1.03 ^{b) c)}	0.44±0.54 ^{b) c)}	6.57±0.54 ^{b) c)}
清热化湿调枢方低剂量组	6	23.50±1.94 ^{a)}	1.17±0.35 ^{a)}	5.82±0.34 ^{a)}

注:DAI,疾病活动指数。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与清热化湿调枢方低剂量组比较, $P<0.05$ 。



注：黑色箭头为炎性细胞浸润，黑色虚线为腺体结构破坏。

图1 各组小鼠结肠组织形态学观察结果（HE染色，×200）

中断，杯状细胞明显减少，隐窝破坏严重，排列紊乱，大量淋巴细胞浸润。清热化湿调枢方中剂量组小鼠可见部分肠黏膜中断，与模型组相比隐窝结构破坏较轻，杯状细胞数目恢复，可见少量淋巴细胞浸润。清热化湿调枢方高剂量组、美沙拉嗪组小鼠结肠黏膜上皮几乎无缺损，可见固有层排列整齐、完整的隐窝，杯状细胞数目较多，极少炎性细胞浸润。

3.4 各组小鼠结肠组织 MUC-2 蛋白表达比较

图2示，正常组 MUC-2 表达为棕黄色颗粒，广泛分布在杯状细胞胞浆（核周及核膜）。与正常组相比，模型组小鼠结肠组织中 MUC-2 阳性（棕黄色颗粒显现为阳性）表达明显减少，清热化湿调枢方低剂量组小鼠结肠组织 MUC-2 阳性表达亦减少。与模型组和清热化湿调枢方低剂量组相比，美沙拉嗪组和清热化湿调枢方高、中剂量组 MUC-2 阳性表达有较明显的恢复。

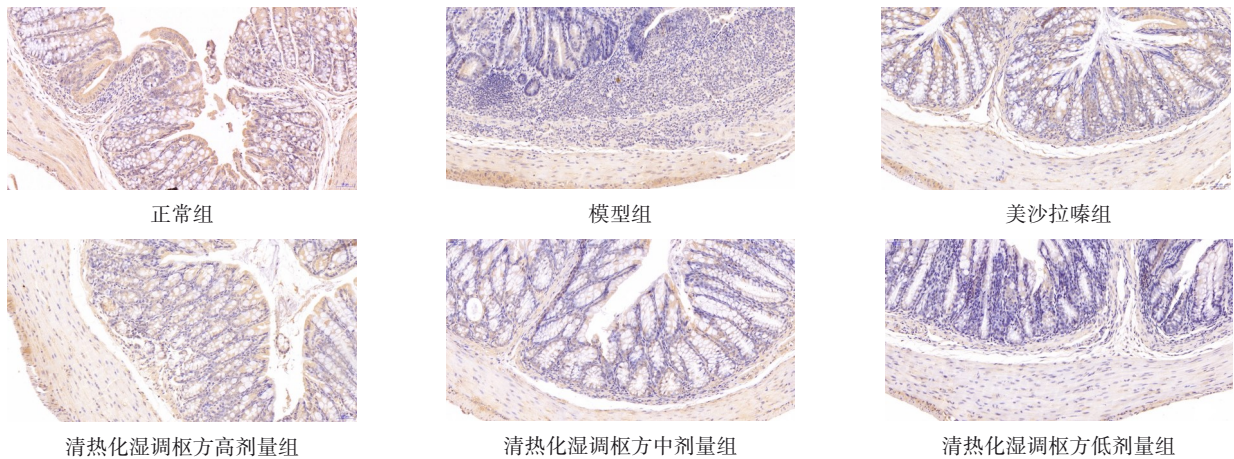
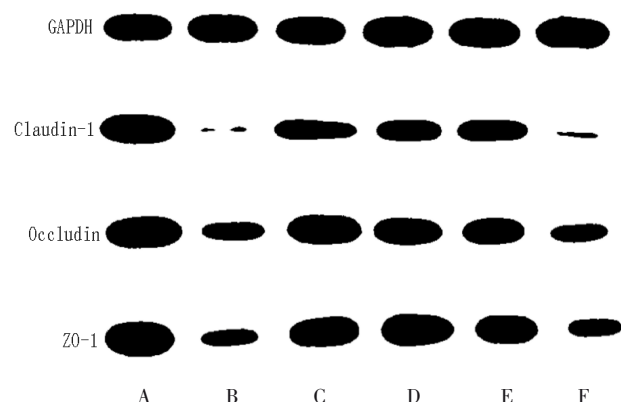


图2 各组小鼠结肠组织黏蛋白2蛋白表达免疫组化结果（×400）

3.5 各组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组和清热化湿调枢方低剂量组小鼠结肠组织 ZO-1 蛋白表达明显降低, 模型组和清热化湿调枢方高、中、低剂量组小鼠结肠组织 Occludin、Claudin-1 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。与模型组和清热化湿调枢方低剂量组比较, 美沙拉嗪组和清热化湿调枢方高、中剂量组小鼠结肠组织 ZO-1、Claudin-1、Occludin 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 且美沙拉嗪组和清热化湿调枢方高、中剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白电泳图见图 3。



注: A, 正常组; B, 模型组; C, 美沙拉嗪组; D, 清热化湿调枢方高剂量组; E, 清热化湿调枢方中剂量组; F, 清热化湿调枢方低剂量组; ZO-1, 带状闭合蛋白 1; Occludin, 咬合蛋白; Claudin-1, 闭合蛋白 1。

图 3 各组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白电泳图

4 讨论

根据临床表现, UC 可归属于中医学“久痢”“泄泻”“休息痢”等范畴。UC 多因饮食不当、情志失常或外感湿热疫毒之邪, 损伤脾胃所致。本病病位虽在大肠, 但脾虚为其本, 亦与胃、肾、肝相关。脾虚湿盛, 郁久化热, 下侵大肠, 与气血搏

结, 致肠道血络脂膜受损, 大肠传导失司, 则下利赤白脓血、腹痛、里急后重等, 治疗当以清肠化湿、补气健脾、调和气血为主。清热化湿调枢方组方中乌梅、败酱草为君, 乌梅酸涩, 能涩肠收敛而止泻; 败酱草归胃、大肠经, 善于清热解毒、消痈排脓。太子参、炒白术、茯苓、甘草为臣药, 共奏健脾益气、运化水湿之效。黄连苦寒, 秦皮苦涩, 两药合用助败酱草清热解毒、燥湿收敛止泻; 枳实破气除痞, 与木香配伍调气而使厚重解除; 当归活血化瘀, 活血则便脓自愈; 儿茶收湿止血, 炒白芍养血柔肝, 缓急止痛; 葛根升清阳而止泻, 上八味共为佐药。甘草亦为使药, 调和诸药。诸药合用共奏清热化湿、调气行血、涩肠止泻、扶正祛邪、健脾调枢之功效。

美沙拉嗪是临床治疗 UC 的首选药物, 能抑制肠道炎症, 降低肠上皮通透性, 减轻炎症反应^[15-17], 故本研究采用美沙拉嗪作为对照药物。本实验结果显示, 与模型组相比, 经美沙拉嗪和高、中剂量清热化湿调枢方干预后的小鼠精神状态、毛发色泽、形态活动、大便稀软及便血等一般情况好转, DAI 评分下降, 结肠组织病理损伤减轻, 黏膜结构有不同程度的恢复。以上结果表明, 高、中剂量清热化湿调枢方在促进 DSS 结肠炎小鼠的一般情况好转、体质量恢复、DAI 评分降低、肠组织病理损伤减轻方面有较好的效果, 其效果与美沙拉嗪相近。

肠黏膜屏障主要包括免疫屏障、机械屏障、生物屏障、化学屏障, 其中以机械屏障即肠上皮屏障最为重要^[18]。MUC-2 是结肠化学屏障中最主要的黏蛋白, 在结肠黏膜杯状细胞的细胞质中表达, 起到润滑作用并可抵御细菌及毒素的侵袭, 在一定程度上可修复机械破坏, 具有保护结肠黏膜的作用^[19]。结肠黏膜屏障中 MUC-2 的含量可以作为结肠黏膜完整及修复程度的重要生物蛋白指标。TJ

表 2 各组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达比较

(/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ZO-1	Occludin	Claudin-1
正常组	6	0.69±0.12	0.98±0.08	0.86±0.08
模型组	6	0.17±0.04 ^{a)}	0.43±0.08 ^{a)}	0.08±0.03 ^{a)}
美沙拉嗪组	6	0.49±0.08 ^{b) c)}	0.86±0.07 ^{b) c)}	0.62±0.11 ^{b) c)}
清热化湿调枢方高剂量组	6	0.61±0.11 ^{b) c)}	0.75±0.06 ^{a) b) c)}	0.47±0.05 ^{a) b) c)}
清热化湿调枢方中剂量组	6	0.52±0.11 ^{b) c)}	0.74±0.13 ^{a) b) c)}	0.51±0.13 ^{a) b) c)}
清热化湿调枢方低剂量组	6	0.21±0.05 ^{a)}	0.36±0.11 ^{a)}	0.07±0.02 ^{a)}

注: ZO-1, 带状闭合蛋白 1; Occludin, 咬合蛋白; Claudin-1, 闭合蛋白 1。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与清热化湿调枢方低剂量组比较, $P<0.05$ 。

是构成肠黏膜机械屏障中复杂且重要的动态结构, TJ 相关蛋白中 Claudins、Occludin、ZO 家族是对肠黏膜通透性及完整性起调节作用的主要蛋白^[7]。在肠黏膜上皮细胞中 ZO-1 一端通过内环与胞质内的 Occludin、Claudins、JMA 等连接, 另一端与细胞骨架成分结合, 将胞质蛋白与细胞骨架系统稳定地连接在一起, 从而维持肠黏膜屏障的稳定与完整性^[20]。Occludin 亦是构成紧密连接复合物的主要结构蛋白, 在 Caco-2 细胞中敲除 Occludin 蛋白后, 可见细胞间的通透性增加^[21], 由此可推断 Occludin 蛋白含量在一定程度上与肠黏膜通透性及完整性相关。Claudins 是一类跨膜蛋白, 其中 Claudin-1 蛋白能够限制离子进入上皮细胞, 并与相邻的相同细胞中的连接蛋白通过膜外的 2 个环之间相连交互作用, 形成围栏结构, 从而降低肠黏膜通透性, 维持肠黏膜机械屏障稳定^[22]。本实验结果发现, 与模型组比较, 在美沙拉嗪和高、中剂量清热化湿调枢方干预后 MUC-2 的阳性表达有较明显的恢复, 结肠组织中 ZO-1、Claudin-1、Occludin 均有较程度的恢复, 说明中、高剂量的清热化湿调枢方对促进杯状细胞、黏蛋白的恢复以及肠黏膜屏障的修复有较明显的效果, 并且其疗效与美沙拉嗪相似。

综上所述, 高、中剂量清热化湿调枢方对促进 DSS 结肠炎小鼠肠黏膜恢复, 维持结肠黏膜屏障的稳定有较好的效果, 作用机制可能与促进黏蛋白 MUC-2、结肠紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin、Claudin-1 的恢复, 促进黏膜愈合, 保护结肠黏膜有关。但本实验只从肠黏膜机械与化学屏障相关蛋白的角度探讨了部分机制, 未涉及免疫、肠道菌群等, 未来可拓宽研究范围, 以提供更强有力的实验证据。

参考文献

- [1] 沈洪, 唐志鹏, 唐旭东, 等. 消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南(基层医生版)[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4155-4160.
- [2] ORDÁS I, ECKMANN L, TALAMINI M, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2012, 380(9853): 1606-1019.
- [3] MATUSIEWICZ M, NEUBAUER K, BEDNARZ-MISA I, et al. Systemic interleukin-9 in inflammatory bowel disease: association with mucosal healing in ulcerative colitis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(22): 4039-4046.
- [4] ALGABA A, LINARES PM, FERNÁNDEZ-CONTRE-RAS ME, et al. Relationship between levels of angiogenic and lymphangiogenic factors and the endoscopic, histological and clinical activity, and acute-phase reactants in

- patients with inflammatory bowel disease[J]. J Crohns Colitis, 2013, 7(11): e569-e579.
- [5] 黄晓燕, 王萌, 郑超伟, 等. 基于 MUC-2 及 CXCR-4 变化探讨四君子汤干预溃疡性结肠炎临床研究[J]. 光明中医, 2019, 34(3): 378-380, 448.
- [6] HAMMER AM, MORRIS NL, EARLEY ZM, et al. The first line of defense: the effects of alcohol on post-burn intestinal barrier, immune cells, and microbiome[J]. Alcohol Res, 2015, 37(2): 209-222.
- [7] TURNER JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(11): 799-809.
- [8] 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.
- [9] 张磊, 陈雪清, 李静君. 乌梅败酱方治疗溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 四川中医, 2007, 25(3): 65-66.
- [10] 张磊, 李利霞, 王梅青. 乌梅败酱方治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎 56 例[J]. 陕西中医, 2004, 25(9): 797-798.
- [11] OKAYASU I, HATAKEYAMA S, YAMADA M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice[J]. Gastroenterology, 1990, 98(3): 694-702.
- [12] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. Nat Protoc, 2017, 12(7): 1295-1309.
- [13] MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120(1): 51-58.
- [14] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1103.
- [15] 胡红卫. 蒙脱石散/美沙拉嗪对结肠炎大鼠肠紧密连接蛋白的影响[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2014.
- [16] 张青波. 益生菌联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的疗效和安全性观察[J]. 山西医药杂志, 2018, 47(1): 76-77.
- [17] FORD AC, ACHKAR JP, KHAN KJ, et al. Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis[J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(4): 601-616.
- [18] MAGUCKIN MA, ERI R, SIMMS LA, et al. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases[J]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15(1): 100-113.

- [19]HO KS, CHANG CC, BAIG MK, et al. Ileal pouch anal anastomosis for ulcerative colitis is feasible for septuagenarians[J]. *Colorectal Dis*, 2006, 8(3):235-238.
- [20]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.
- [21]AL-SADI R, KHATIB K, GUO S, et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(6):61054-61064.
- [22]HERING NA, FROMM M, SCHULZKE JD. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics [J]. *J Physiol*, 2012, 590(5):1035-1044.

Effects of *Qingre Huashi Tiaoshu Formula* (清热化湿调枢方) on Intestinal Mucosal Barrier and Expression of Related Proteins in Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis Model Mice

SU Xiaolan¹, YAO Mengxi^{1,2}, CHEN Lin¹, ZHANG Tao^{1,2}, WANG Lin^{1,2}, QING Xiangli^{1,3}, ZHANG Gezhi^{1,2}, WEI Wei¹

1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100102; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences; 3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Qingre Huashi Tiaoshu Formula* (清热化湿调枢方, QHTF) in the treatment of ulcerative colitis (UC). **Methods** Thirty-six C57BL/6 male mice were included, of which six mice were randomly selected as normal group, and the rest were given 2.5% dextran sodium sulfate (DSS) aqueous solution for 7 days to prepare DSS-induced colitis mice. The successfully modeled mice were randomly divided into five groups, namely the model group, mesalazine group, and the low-, medium- and high-dose QHTF groups, with six mice in each group. Then the normal group and the model group were given 0.5 ml of pure water by gavage; mice in the mesalazine group were given 0.52 g/(kg·d) of mesalazine suspension by gavage; mice in the low-, medium- and high-dose QHTF groups were given 0.845, 1.69, and 3.38 g/(kg·d) of QHTF suspension by gavage. All groups were intervened once a day for 10 consecutive days. After intervention, the body weight, disease activity index (DAI), colon length, colon histopathological results were observed, and the positive expression of colonic tissue mucin 2 (MUC-2) and the expression of occludin 1 (ZO-1), claudin 1 (Claudin-1) and occludin (Occludin) were detected. **Results** Compared to those of mice in the normal group, the body weight of mice in the model group and low-dose QHTF group decreased, and the DAI score increased, while colon length was shortened, and the expression of ZO-1, Occludin, and Claudin-1 in the colonic tissue decreased ($P < 0.05$). Compared to the model group and low-dose QHTF group, the other three groups had increased body weight, decreased DAI, longer colon length, and increased expression of ZO-1, Occludin, and Claudin-1 ($P < 0.05$). In the normal group, the intestinal mucosal epithelium of the mice was intact with no inflammatory cell infiltration, while in the model group, the intestinal mucosal epithelium was defective with significantly reduced goblet cells, severely damaged and disorderly arranged lamina propria and crypts structure, and a large number of infiltrated lymphocytes; in the high-dose QHTF group and mesalazine group, the colonic mucosal epithelium had almost no defect and very little inflammatory cell infiltration, while in the middle- and low-dose QHTF groups, it was not significantly improved. The MUC-2 was expressed in brown-yellow granules, widely distributed in the cytoplasm (perinuclear and nuclear membrane) in the normal group; the positive expression of MUC-2 was significantly reduced in the model group; in the mesalazine group and the high- and medium-dose QHTF groups, the positive expression of MUC-2 was significantly restored compared to that in the model group. **Conclusion** High- and medium-dose QHTF have certain effect on repairing the intestinal mucosal barrier damage in DSS colitis mice, and the mechanism may be related to its action on increasing the expression of MUC-2 in the colonic tissue, promoting the secretion of ZO-1, Occludin, and Claudin-1, thereby promoting the repair of mucosal chemical and mechanical barriers, and maintaining the homeostasis of intestinal mucosal barrier.

Keywords ulcerative colitis; *Qingre Huashi Tiaoshu Formula* (清热化湿调枢方); colon tissue; intestinal mucosal barrier; mucin; tight junction proteins

(收稿日期: 2022-01-06; 修回日期: 2022-04-21)

[编辑: 邓媛]