

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.24.012

葛根芩连汤加味方对溃疡性结肠炎模型小鼠肠黏膜屏障及上皮间质转化的影响

方俐晖^{1,2}, 张佳琪², 胡蓝烁^{1,2}, 王忻彤², 刘珊², 汪月丹², 黄金科², 唐旭东²✉

1. 北京中医药大学研究生院, 北京市朝阳区北三环东路11号, 100029; 2. 中国中医科学院西苑医院脾胃病研究所

[摘要] **目的** 从上皮屏障损伤和上皮间质转化角度探讨葛根芩连汤加味方治疗溃疡性结肠炎的可能作用机制。**方法** 将60只雄性C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组、西药对照组和葛根芩连汤加味方低、中、高剂量组, 每组10只。除空白组外其余各组小鼠采用3%葡聚糖硫酸钠自由饮用7天诱导结肠炎模型, 造模第1天开始葛根芩连汤加味方低、中、高剂量组分别给予葛根芩连汤加味方6、12、24 g/(kg·d)灌胃, 西药对照组给予5-氨基水杨酸100 mg/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组小鼠给予10 ml/kg蒸馏水灌胃, 每日1次, 共7天。每天记录小鼠体质量并进行疾病活动指数(DAI)评分。末次给药后24 h麻醉小鼠并取结肠观察结肠长度, 应用HE染色观察结肠组织病理变化并进行病理组织学评分, Masson染色检测结肠胶原纤维面积占比, 免疫荧光观察结肠黏膜上皮F-肌动蛋白(F-actin)分布表达, 免疫组化检测紧密连接蛋白1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达。**结果** 与空白组同时间比较, 造模第7天模型组小鼠体质量百分比明显下降、DAI评分明显升高($P<0.01$); 与模型组同时间比较, 西药对照组和葛根芩连汤加味方各剂量组小鼠的体质量下降, 西药对照组和葛根芩连汤高剂量组DAI评分降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与葛根芩连汤低剂量组同时间比较, 葛根芩连汤高剂量组和西药对照组小鼠体质量明显增加($P<0.05$)。与空白组比较, 模型组小鼠结肠长度明显缩短, 病理组织学评分、胶原面积占比明显升高, F-actin平均荧光强度降低, 结肠组织ZO-1、Occludin、E-cadherin蛋白水平下降, Vimentin蛋白水平升高($P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组小鼠结肠长度明显增加, 病理组织学评分、胶原面积占比降低, ZO-1、Occludin、E-cadherin蛋白水平升高, Vimentin水平降低; 西药对照组和葛根芩连汤加味方中、高剂量组F-actin平均荧光强度增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与葛根芩连汤加味方低剂量组比较, 葛根芩连汤加味方中剂量组及西药对照组胶原纤维面积占比降低; 葛根芩连汤加味方中剂量组F-actin平均荧光强度升高; 西药对照组ZO-1、E-cadherin蛋白水平升高, 葛根芩连汤加味方高剂量组ZO-1蛋白水平升高($P<0.05$)。与葛根芩连汤加味方中剂量组比较, 葛根芩连汤加味方高剂量组与西药对照组ZO-1蛋白水平升高($P<0.05$)。与葛根芩连汤加味方高剂量组比较, 西药对照组E-cadherin、Vimentin蛋白水平均升高($P<0.05$)。**结论** 葛根芩连汤加味方能够减轻溃疡性结肠炎模型小鼠结肠炎症及黏膜屏障损伤, 抑制上皮间质转化进程, 可能是其作用机制之一。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 葛根芩连汤; 肠黏膜屏障; 上皮间质转化; 疾病活动指数

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病, 临床表现为反复发

作的黏液脓血便, 特点为结直肠黏膜连续性、弥漫性炎症病变^[1]。目前中国UC患病率仍处于上升阶段, 给患者带来了健康和经济负担^[2]。葛根芩连汤是张仲景《伤寒论》中治疗湿热下利的经典名方, 对UC也具有良好的治疗作用^[3]。本团队结合临床实践经验, 在清热利湿群药中加入温中止痢之反佐

基金项目:国家自然科学基金(82341233); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A01012); 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项(ZZ15-YQ-002); 中国中医科学院西苑医院中医药临床科研一体化平台建设专项(XYZX0405-34)

✉ 通讯作者: txdlly@sina.com

中药,改良形成葛根芩连汤加味方,且前期研究显示其可明显改善急性结肠炎的结肠炎症^[4]。目前 UC 的发病原因及病理机制尚不明确,但研究显示,UC 患者中可观察到肠黏膜屏障破坏,肠道通透性增加,更多肠内抗原穿过该屏障时,现有的耐受机制失效,导致局部免疫细胞受到刺激,进一步加剧炎症过程^[5]。持续的炎症对肠道过度损伤引起不可逆的伤口愈合反应,会引起以肠黏膜及黏膜下层细胞外基质异常沉积为主要改变的肠道纤维化^[6]。在此期间,上皮细胞可能会沿着上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)的过程转变为间质细胞,产生以胶原纤维为主的细胞外基质^[6]。因此,本研究从黏膜屏障损伤及上皮间质转化角度探讨葛根芩连汤加味方治疗 UC 的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本实验经中国中医科学院西苑医院动物实验伦理审查委员会批准(批准号:2019XLC003-5)。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 60 只,6~8 周龄,体质量 20~22 g,购自北京斯贝福生物科技有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心,12/12 h 光暗循环,室温(24±1)℃,相对湿度 50%~60%,所有小鼠自由饮水摄食。

1.2 药物

葛根芩连汤加味方组成:葛根、黄芩、黄连按 5:3:3 配比并进行加味,实验所用药物均购自中国中医科学院西苑医院药房,由中国中医科学院西苑医院制剂室制成每克浸膏粉含生药 3.79 g。5-氨基水杨酸(5ASA,货号:A129982),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,以蒸馏水配置成 10 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂和仪器

葡聚糖硫酸钠(DSS,相对分子质量 36 000~50 000,货号:160110),美国 MP 公司;戊巴比妥钠(货号:57-33-0),德国 Merck 公司;波形蛋白(Vimentin)、闭合蛋白(Occludin)、山羊抗兔、羊抗小鼠抗体(货号分别为 60330-1-Ig、66378-1-Ig、RGAR001、RGAM001),美国 Proteintech 公司;紧密连接蛋白 1(ZO-1)抗体(货号:33-9100),美国 Thermo Fisher 公司;E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(货号:ab231303),英国 Abcam 公司;4%多

聚甲醛通用组织固定液、苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒、Masson 染液套装、DAPI 染色试剂、鬼笔环肽染色试剂(货号分别为 G1101、G1076、G1006、G1012、G1041),武汉赛维尔生物科技有限公司。

多功能微孔板检测仪(型号:Synergy LX),美国 Biotek 公司;冷冻离心机(型号:Z326K),德国 Hermle 公司;发光成像系统(型号:GelView 6000Plus),广州博鹭腾生物科技有限公司;正置光学显微镜(型号:Nikon Eclipse E100),日本尼康公司。

1.4 动物造模分组及干预方法

适应性饲养 7 天后,使用 SPSS 25.0 软件生成的随机数字表将 60 只小鼠分为空白组、模型组、西药对照组及葛根芩连汤加味方低、中、高剂量组,每组 10 只。除空白组外,其余各组小鼠给予 3%DSS 溶液自由饮用 7 天,以诱导 UC 小鼠模型^[7-9]。在造模第 8 天,以小鼠出现体重减轻、稀便、便潜血阳性或肉眼血便,疾病活动指数(DAI)升高评价为造模成功^[10]。

根据《中药药理研究方法学》实验动物与人体给药剂量换算比率^[11],以成人每日剂量折算小鼠等效剂量为中剂量,葛根芩连汤加味方低、中、高剂量组分别给予葛根芩连汤加味方生药量 6、12、24 g/(kg·d)灌胃,西药对照组给予 5ASA 溶液 100 mg/(kg·d)灌胃,空白组和模型组小鼠给予 10 ml/kg 蒸馏水灌胃。从造模第 1 天开始到实验结束每日灌胃 1 次,共 7 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况和 DAI 评分 实验期间每天监测小鼠皮毛色泽、精神状态、活动情况。每天进行体质量、大便性状和便血程度评分,以计算 DAI 评分^[10],DAI 评分=(体质量下降积分+大便性状积分+便血积分)/3。体质量百分比(%)=每日体质量/初始体质量×100%。

1.5.2 结肠组织病理学分析 末次给药后禁食 24 h,用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,脱颈处死后完整分离出小鼠结肠,测量结肠长度并纵向切开,收集结肠组织。将 1.0 cm 远端结肠固定在 4% 多聚甲醛溶液中,依次脱水浸蜡、石蜡包埋、切片后进行 HE 染色。显微镜下观察并采集图片,进行病理组织学评分^[12],包括炎症程度、损伤范围、隐窝破坏及受累占比,总积分为各部分评分相加。

1.5.3 结肠组织胶原纤维面积占比 将小鼠结肠组织石蜡切片脱蜡至水,切片浸入 Masson A 液中浸泡过夜,入 Masson B 液及 Masson C 液等比混合的染液,浸染 1 min,入 Masson D 液浸染 6 min,自来水漂洗,Masson E 液浸染 1 min,不水洗,稍沥干直接入 Masson F 液染 2~30 s,用 1% 醋酸漂洗分化,无水乙醇脱水,透明封片后显微镜镜检拍照,使用 Image-J 1.54f 软件分析胶原纤维面积,胶原纤维面积占比=胶原纤维面积/组织总面积 $\times 100\%$ 。

1.5.4 免疫组化法检测结肠组织紧密连接蛋白及上皮间质转化相关蛋白水平 紧密连接蛋白包括 Occludin、ZO-1,上皮间质转化相关蛋白包括 E-cadherin、Vimentin。使用 SPSS 25.0 软件生成的随机数字表每组选出 6 只小鼠,将结肠组织石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,封闭,接着分别加抗 E-cadherin 抗体(1:1000)、抗 Vimentin 抗体(1:8000)、抗 Occludin 抗体(1:500)和抗 ZO-1 抗体(1:1000)一抗,4℃孵育过夜,加二抗,室温孵育 50 min,DAB 显色,复染细胞核,置于显微镜下进行结果判读。结果通过 Image-Pro Plus 6.0 软件对平均光密度值(IOD Sum/Area Sum)进行分析。

1.5.5 免疫荧光法检测结肠细胞骨架 F-肌动蛋白(F-actin)分布及水平 采用鬼笔环肽染色细胞骨架 F-actin,添加 DAPI 并在黑暗中室温孵育 10 min,最后用抗荧光淬灭封膜剂封片,通过荧光显微镜获取图像,使用 Image-J 1.54f 软件对平均荧光强度进行分析。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差表示,非正态分布的数据以中位数(四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示。先进行正态性检验和方差齐性检验,若数据符合正态分布采用单因素方差分

析,多组间比较应用 Bonferroni 进行校正,校正后以 $P<0.05$ 为具有显著性;若数据不符合正态分布,采用非参数检验(Kruskal-walli 检验)。以 $P<0.05$ 为差异具有统计意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况及不同时间 DAI 评分比较

空白组小鼠一般状况良好,大便正常,精神状态良好,活动正常,毛发光泽,体质量自然增长;与空白组比较,模型组小鼠在造模第 4 天起出现肉眼血便、精神萎靡、活动减少、毛发杂乱等表现,第 5 天起体质量下降;与模型组比较,各给药组小鼠肉眼血便较少,精神萎靡、活动减少、毛发杂乱等表现减轻,葛根芩连汤加味方不同剂量组及西药对照组之间无明显差异。表 1、表 2 示,造模第 1 天至第 3 天各组小鼠体质量及 DAI 评分比较差异均无统计学意义($P>0.05$);与空白组同时间比较,造模第 5 天至第 7 天模型组小鼠体质量百分比明显下降,第 4 天至第 7 天 DAI 评分明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组同时间比较,西药对照组和葛根芩连汤加味方高剂量组第 6、7 天体质量增加,葛根芩连汤加味方中、低剂量组小鼠体质量仅第 7 天时增加,西药对照组第 5 天至第 7 天 DAI 评分降低,葛根芩连汤加味方低剂量组 DAI 评分仅第 6 天降低,葛根芩连汤加味方中剂量组 DAI 评分第 5、6 天降低,葛根芩连汤加味方高剂量组 DAI 评分第 6、7 天降低($P<0.05$);与葛根芩连汤低剂量组同时间比较,葛根芩连汤高剂量组和西药对照组小鼠体质量增加($P<0.05$)。

2.2 各组小鼠结肠长度及病理组织学评分比较

表 3 示,与空白组比较,模型组小鼠结肠长度明显缩短,病理组织学评分明显升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠结肠长度明显增加,病理组织学评分降低($P<0.05$);各给药组组间比较,结肠长度和病理组织学评分差异均无统计学

表 1 各组小鼠不同时间体质量百分比比较

Table 1 Comparison of body mass percentage of mice in different groups at different times

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

组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
空白组	10	101.84 $\pm$ 1.64	101.88 $\pm$ 1.84	103.11 $\pm$ 1.73	103.39 $\pm$ 2.13	104.00 $\pm$ 2.15	105.46 $\pm$ 2.32	105.57 $\pm$ 2.46
模型组	10	100.28 $\pm$ 1.25	100.08 $\pm$ 1.55	99.82 $\pm$ 2.38	99.40 $\pm$ 2.35	97.67 $\pm$ 4.35 ^{a)}	93.39 $\pm$ 4.68 ^{a)}	88.08 $\pm$ 5.07 ^{a)}
西药对照组	10	99.26 $\pm$ 4.30	100.59 $\pm$ 2.54	99.82 $\pm$ 4.10	99.98 $\pm$ 4.92	101.19 $\pm$ 2.54	98.88 $\pm$ 2.68 ^{b)}	97.97 $\pm$ 2.60 ^{b) c)}
葛根芩连汤加味方低剂量组	10	101.10 $\pm$ 2.31	100.55 $\pm$ 1.84	99.54 $\pm$ 2.68	100.03 $\pm$ 1.71	100.20 $\pm$ 1.94	97.65 $\pm$ 2.86	94.52 $\pm$ 3.57 ^{b)}
葛根芩连汤加味方中剂量组	10	100.81 $\pm$ 3.27	100.34 $\pm$ 3.73	100.28 $\pm$ 3.63	99.04 $\pm$ 4.58	98.27 $\pm$ 5.84	97.89 $\pm$ 2.68	96.73 $\pm$ 3.59 ^{b)}
葛根芩连汤加味方高剂量组	10	101.21 $\pm$ 0.73	101.68 $\pm$ 0.93	101.77 $\pm$ 1.93	100.18 $\pm$ 1.74	101.61 $\pm$ 1.71	100.21 $\pm$ 1.60 ^{b)}	99.26 $\pm$ 1.68 ^{b) c)}

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.01$; b) 与模型组同时间比较, $P<0.01$; c) 与葛根芩连汤加味方低剂量组同时间比较, $P<0.05$ 。

表2 各组小鼠不同时间 DAI 评分比较

Table 2 Comparison of disease activity index scores among different groups of mice at different times [分, $M(P_{25}, P_{75})$]								
组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
空白组	10	0	0	0	0	0	0	0
模型组	10	0	0.33	0.17	1.50	1.67	3.33	3.67
		(0.00,0.17)	(0.00,0.33)	(0.00,0.33)	(0.00,1.67) ^{a)}	(1.33,1.75) ^{b)}	(1.67,3.42) ^{b)}	(3.33,4.00) ^{b)}
西药对照组	10	0	0	0.17	0	0.67	1.33	1.67
		(0.00,0.17)	(0.00,0.33)	(0.00,0.33)	(0.00,1.67)	(0.00,1.33) ^{c)}	(0.33,2.00) ^{c)}	(1.33,2.83) ^{c)}
葛根芩连汤加味方低剂量组	10	0	0	0	0.33	1.00	1.83	3.17
		(0.00,0.33)	(0.00,0.33)	(0.00,0.33)	(0.00,1.67)	(0.17,1.58)	(1.33,2.33) ^{c)}	(1.42,2.00)
葛根芩连汤加味方中剂量组	10	0	0	0	0.67	0.67	1.67	2.67
					(0.00,1.67)	(0.00,1.67) ^{c)}	(1.33,2.00) ^{c)}	(1.58,3.33)
葛根芩连汤加味方高剂量组	10	0	0	0	0	1.00	1.50	1.83
				(0.00,0.17)	(0.00,1.00)	(0.00,1.33)	(0.67,1.67) ^{c)}	(1.42,2.00) ^{c)}

注：DAI，疾病活动指数。
a) 与空白组同时间比较， $P<0.05$ ；b) 与空白组同时间比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ 。

意义 ($P>0.05$)。图1示，空白组小鼠结肠黏膜完好，腺体排列整齐，隐窝结构完整，无明显炎症浸润。模型组小鼠结肠黏膜完整性被破坏，腺体排列紊乱，隐窝脓肿、隐窝结构改变甚至消失，大量炎症细胞浸润在黏膜层及黏膜下层。葛根芩连汤加味方各剂量组和西药对照组小鼠肠黏膜病理损伤较模型组均有不同程度改善，但葛根芩连汤加味方低剂量组小鼠肠黏膜上皮完整性仍被破坏，黏膜层炎症浸润情况较其他给药组明显；西药对照组及葛根芩连汤加味方中、高剂量组黏膜上皮较完整，黏膜层及黏膜下层炎症细胞浸润较少，隐窝结构较完整。

2.3 各组小鼠结肠胶原纤维沉积比较

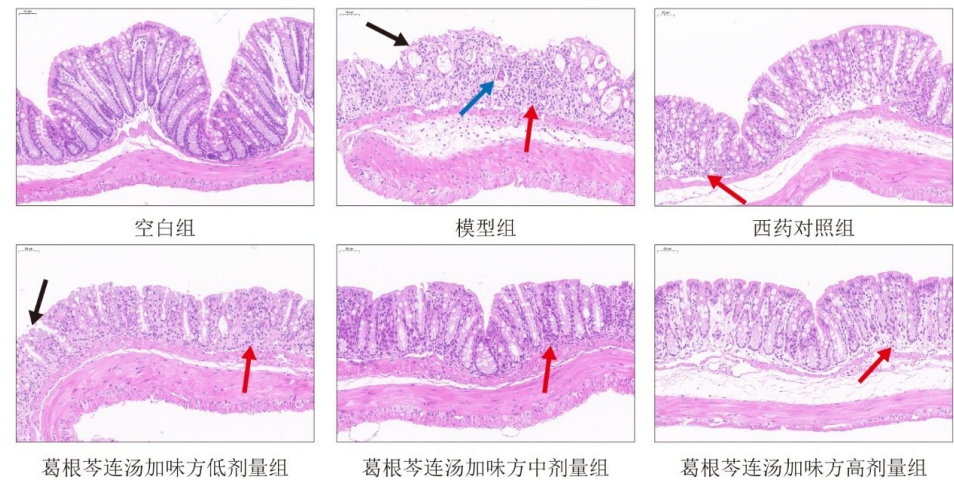
图2 (Masson 染色) 示，空白组小鼠结肠黏膜及黏膜下层仅有少量蓝染的纤维组织，肌纤维和细

表3 各组小鼠结肠长度及病理组织学评分比较
Table 3 Comparison of colon length and pathological scores among in each group of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	结肠长度/cm	病理组织学评分/分
空白组	10	7.42±0.53	0
模型组	10	4.81±0.24 ^{a)}	10.60±1.08 ^{a)}
西药对照组	10	5.71±0.33 ^{b)}	4.89±0.78 ^{b)}
葛根芩连汤加味方低剂量组	10	5.58±0.67 ^{b)}	6.88±2.30 ^{b)}
葛根芩连汤加味方中剂量组	10	5.92±0.66 ^{b)}	5.17±1.60 ^{b)}
葛根芩连汤加味方高剂量组	10	5.90±0.43 ^{b)}	4.25±1.39 ^{b)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

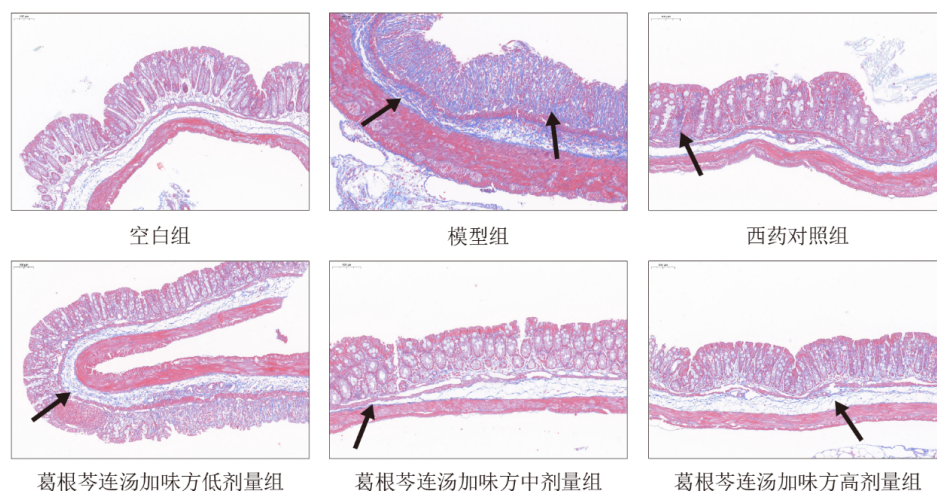
胞质呈红染，而模型组小鼠结肠黏膜及黏膜下层呈弥漫性蓝染，提示明显胶原纤维沉积。与模型组比较，各给药组小鼠结肠黏膜及黏膜下层蓝染减少，



注：图中黑色箭头指示结肠黏膜上皮破坏，蓝色箭头指示隐窝脓肿，红色箭头指示炎症细胞浸润。

图1 各组小鼠结肠组织病理形态变化 (HE 染色, ×200)

Figure 1 Pathological changes and scoring of colon tissues in each group of mice (HE staining, ×200)



注：图中黑色箭头指示的蓝染部分为胶原纤维表达。

图2 各组小鼠结肠 Masson 染色图 (×100)

Figure 2 Comparison of Masson staining and collagen fibre expression in the colon of mice in each group (×100)

而葛根芩连汤加味方低剂量组黏膜下层蓝染范围较广，葛根芩连汤加味方中、高剂量组及西药对照组黏膜下层蓝染较少，黏膜层隐窝间仍有少量蓝染。表4示，与空白组比较，模型组小鼠结肠组织胶原纤维面积占比明显升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，葛根芩连汤加味方各剂量组和西药对照组胶原纤维面积占比明显降低 ($P<0.01$)；与葛根芩连汤加味方低剂量组比较，葛根芩连汤加味方中剂量组及西药对照组胶原纤维面积占比降低 ($P<0.05$)；葛根芩连汤加味方中剂量组及西药对照组胶原纤维面积占比比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表4 各组小鼠结肠胶原纤维沉积面积占比比较

Table 4 Comparison of the percentage area of collagen fiber deposition in the colon of mice in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胶原纤维面积占比
空白组	10	4.85±1.16
模型组	10	15.37±2.94 ^{a)}
西药对照组	10	5.74±2.24 ^{b) c)}
葛根芩连汤加味方低剂量组	10	8.21±1.52 ^{b)}
葛根芩连汤加味方中剂量组	10	5.32±1.38 ^{b) c)}
葛根芩连汤加味方高剂量组	10	6.18±2.19 ^{b)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与葛根芩连汤加味方低剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠结肠 F-actin 分布及水平比较

图3示，通过对小鼠结肠黏膜 F-actin 鬼笔环肽染色，空白组 F-actin 在结肠黏膜上皮细胞周围分布均匀连续；模型组 F-actin 分布不匀，肌动蛋白丝断裂。与模型组比较，葛根芩连汤加味方各剂量

组及西药对照组 F-actin 损伤程度均有所减轻，其中葛根芩连汤加味方低剂量组和西药对照组小鼠结肠黏膜隐窝部 F-actin 分布稍有不匀，葛根芩连汤加味方中、高剂量组黏膜上皮及隐窝部 F-actin 分布较均匀。表5示，与空白组比较，模型组 F-actin 平均荧光强度降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，西药对照组和葛根芩连汤加味方中、高剂量组 F-actin 平均荧光强度升高 ($P<0.05$)，而葛根芩连汤加味方低剂量组差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与葛根芩连汤加味方低剂量组比较，葛根芩连汤加味方中剂量组 F-actin 平均荧光强度升高 ($P<0.05$)；葛根芩连汤加味方中、高剂量组和西药对照组组间比较，F-actin 平均荧光强度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表5 各组小鼠结肠 F-actin 平均荧光强度比较

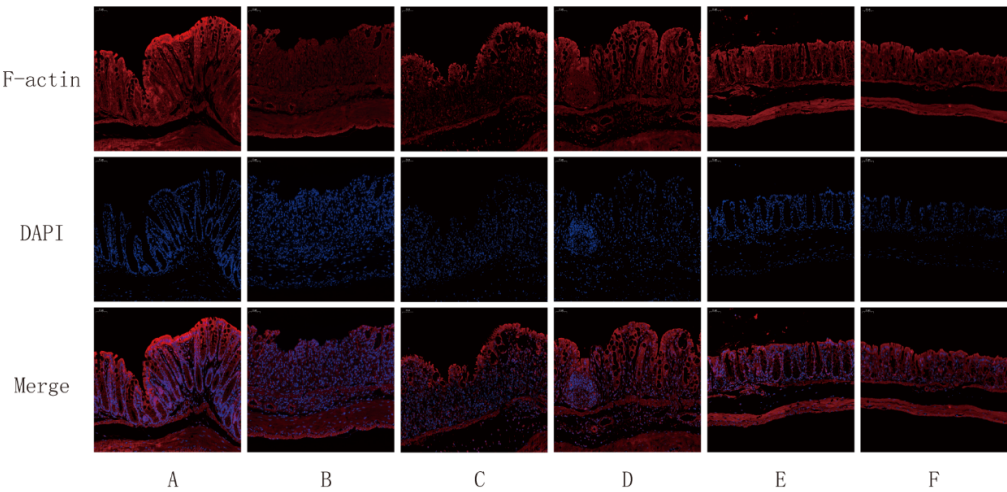
Table 5 Comparison of mean fluorescence intensity of F-actin in colon of mice in each group [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	平均荧光强度
空白组	6	16.29 (15.22, 16.88)
模型组	6	5.32 (5.00, 6.36) ^{a)}
西药对照组	6	11.20 (10.48, 11.68) ^{b)}
葛根芩连汤加味方低剂量组	6	8.39 (7.32, 8.63)
葛根芩连汤加味方中剂量组	6	14.41 (12.18, 14.90) ^{b) c)}
葛根芩连汤加味方高剂量组	6	13.18 (11.13, 13.84) ^{b)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与葛根芩连汤加味方低剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.5 各组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、E-cadherin、Vimentin 蛋白水平比较

表6示，与空白组比较，模型组小鼠结肠组织



注：A，空白组；B，模型组；C，西药对照组；D，葛根芩连汤加味方低剂量组；E，葛根芩连汤加味方中剂量组；F，葛根芩连汤加味方高剂量组。图中红色荧光为 F-actin 蛋白表达，DAPI 蓝色荧光为细胞核表达，Merge 为合成图。

图3 各组小鼠结肠鬼笔环肽染色 (×200)

Figure 3 Phalloidin staining of the colon of mice in each group (×200)

ZO-1、Occludin、E-cadherin蛋白水平降低，Vimentin蛋白水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，葛根芩连汤加味方各剂量组和西药对照组小鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、E-cadherin蛋白水平升高，Vimentin蛋白水平降低 ($P<0.01$)；与葛根芩连汤加味方低剂量组比较，西药对照组 ZO-1、E-cadherin蛋白水平升高，葛根芩连汤加味方高剂量组 ZO-1 蛋白水平升高 ($P<0.05$)；与葛根芩连汤加味方中剂量组比较，葛根芩连汤加味方高剂量组与西药对照组 ZO-1 蛋白水平升高 ($P<0.05$)；与葛根芩连汤加味方高剂量组比较，西药对照组 E-cadherin、Vimentin 蛋白水平均升高 ($P<0.05$)。各给药组 Occludin 蛋白水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

根据 UC 腹痛、腹泻、黏液脓血便等症状，其可归属于中医学“休息痢”“肠癖”“便血”“泄泻”“久痢”等范畴^[13]。UC 的病因主要与禀赋失常、感受外邪、饮食所伤、情志失调、劳倦内伤、病后体虚等有关，病位在大肠，与脾、肝、肾等脏腑功能失调有关。有研究^[14]显示，UC 总体证候分布以大肠湿热证最多（占比 23.32%），且活动期 UC 中大肠湿热证的占比更为明显（36.09%），因此清热祛湿法是 UC 的主要治法。葛根芩连汤来源于《伤寒论》，其中葛根既能外解肌表之邪，又能内清阳明之热，还能升津止泻；黄芩、黄连清热燥湿、泻火解毒；炙甘草甘缓和中，调和诸药，全方共奏清

表6 各组小鼠结肠 ZO-1、Occludin、E-cadherin、Vimentin 蛋白平均光密度值比较

Table 6 Comparison of average optical density values of ZO-1, Occludin, E-cadherin, and Vimentin proteins in the colon of mice in each group					
组别	只数	ZO-1	Occludin	E-cadherin	Vimentin
空白组	6	0.13±0.01	0.10 (0.09, 0.10)	0.15±0.02	0.05±0.01
模型组	6	0.06±0.00 ^{a)}	0.04 (0.04, 0.05) ^{a)}	0.06±0.01 ^{a)}	0.08±0.01 ^{a)}
西药对照组	6	0.12±0.01 ^{b) c) d)}	0.09 (0.09, 0.13) ^{b)}	0.13±0.01 ^{b) c) e)}	0.05±0.01 ^{b) c)}
葛根芩连汤加味方低剂量组	6	0.08±0.01 ^{b)}	0.10 (0.08, 0.10) ^{b)}	0.10±0.02 ^{b)}	0.05±0.00 ^{b)}
葛根芩连汤加味方中剂量组	6	0.10±0.01 ^{b)}	0.10 (0.09, 0.10) ^{b)}	0.12±0.01 ^{b)}	0.05±0.01 ^{b)}
葛根芩连汤加味方高剂量组	6	0.11±0.01 ^{b) c) d)}	0.07 (0.06, 0.07) ^{b)}	0.11±0.01 ^{b)}	0.04±0.01 ^{b)}

注：Occludin，闭合蛋白；ZO-1，紧密连接蛋白1；E-cadherin，E-钙黏蛋白；Vimentin，波形蛋白。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与葛根芩连汤加味方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与葛根芩连汤加味方中剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与葛根芩连汤加味方高剂量组比较， $P<0.05$ 。

热利湿止痢之功。然而 UC 病程持续迁延常导致脾胃虚寒,并且清热止泻药往往苦寒,因此本团队常在葛根芩连汤基础上加入干姜、肉桂等药以温中止痢,或用马齿苋等性味苦寒较轻的药物,精炼为葛根芩连汤加味方,起到清热治痢而不伤正的作用。

肠道上皮是宿主免疫应答系统和肠道微生物群之间的界面,肠道上皮在先天性免疫系统中起着关键作用,肠上皮细胞通过不同蛋白质复合物紧密互连,包括紧密连接蛋白(Occludin、ZO-1等)、黏附连接(E-cadherin、肌动蛋白等)以及桥粒等^[15]。这些细胞与细胞的连接对于稳定细胞的机械内聚力、定义顶端膜区域和基底外侧膜区域之间的边界是必需的,并且对于细胞通透性的调节也至关重要。微丝是构成细胞骨架的重要部分,也是细胞间连接的关键组成,其基本结构为肌动蛋白,主要以聚合体 F-actin 保证细胞的稳定性,而炎症刺激会导致 F-actin 的重组和解聚,从而破坏细胞间连接,增加上皮细胞通透性^[16]。本研究结果显示,DSS 诱导的 UC 模型小鼠肉眼血便明显,体质量下降,DAI 评分升高,HE 染色显示肠黏膜上皮完整性被破坏,腺体排列紊乱,隐窝脓肿、隐窝结构改变甚至消失,大量炎症细胞浸润在黏膜层及黏膜下层,病理组织学评分明显升高。免疫荧光染色显示,模型组细胞骨架 F-actin 表达分布不均,肌动蛋白丝断裂,免疫组化显示紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 表达降低,提示肠黏膜上皮损伤,通透性破坏。通过造模同时给予葛根芩连汤加味方各剂量或 5ASA 以后,小鼠体质量下降得到缓解,肠黏膜上皮损伤减轻,F-actin 分布均匀,ZO-1、Occludin 蛋白表达升高,提示葛根芩连汤加味方能够保护 UC 小鼠的肠黏膜上皮屏障功能。组间比较显示,葛根芩连汤加味方低剂量组在升高体质量方面较西药对照组和葛根芩连汤加味方高剂量组差,在升高 F-actin 平均荧光强度方面弱于葛根芩连汤加味方中剂量组。在升高 ZO-1 蛋白水平方面以西药对照组最优,葛根芩连汤加味高剂量组优于中、低剂量组,且呈剂量依赖性。

在 EMT 过程中,上皮细胞失去连接和顶端-基底极性,细胞骨架重排^[17],上皮细胞标志物 E-cadherin 表达降低,间质细胞标志物 Vimentin 等表达升高^[18]。本研究同样发现,DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜及黏膜下层存在明显胶原纤维沉积,EMT 相关蛋白 E-cadherin 表达降低,Vimentin 表达增高,提示存在上皮间质转化过程,促进了结肠炎

相关肠纤维化。肠黏膜对持续炎症刺激导致的异常修复会导致细胞外基质沉积,与激活 EMT 程序有关,并最终导致纤维化^[19]。然而 EMT 的过程并非不可逆,间质细胞在一个称为间质上皮转化(MET)的过程中分化为上皮细胞^[20]。这两个过程在正常发育中保持动态平衡,而在病理条件下会产生失衡,然而上皮细胞部分或完全转变为间充质细胞并返回的能力说明了上皮表型可塑性,因此,也有研究靶向针对 EMT 来抑制肠道纤维化^[21]。组间比较显示,葛根芩连汤加味方低剂量组在减少胶原纤维沉积面积、增加 E-cadherin 及减少 Vimentin 蛋白水平方面效果较西药对照组差;葛根芩连汤加味方高剂量组在减少 Vimentin 蛋白水平方面较西药对照组好。

综上所述,葛根芩连汤加味方能够减轻 DSS 诱导的 UC 模型小鼠结肠炎症及黏膜屏障损伤,还能抑制炎症刺激导致的上皮间质转化进程,提示葛根芩连汤加味方具有保护 UC 肠黏膜完整性、抑制进一步病变的潜力。然而本研究仍存在一定不足,主要关注葛根芩连汤加味方在急性 UC 中的影响,对长期慢性炎症刺激导致的可能的进一步病变以及上皮间质转化到肠纤维化过程中潜在的治疗机制尚未开展研究,未来可构建慢性模型,进一步阐明相关治疗机制及靶点。

参考文献

- [1] 中华中医药学会《溃疡性结肠炎中医诊疗指南》项目组. 溃疡性结肠炎中医诊疗指南(2023)[J]. 中医杂志, 2024, 65(7): 763-768.
- [2] YU Q, ZHU C, FENG S, et al. Economic burden and health care access for patients with inflammatory bowel diseases in China: web-based survey study [J]. J Med Internet Res, 2021, 23(1): e20629.
- [3] 刘光桥,罗伟生,杨爽. 葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 中国中医急症, 2021, 30(9): 1679-1681.
- [4] WANG Y, ZHANG J, XU L, et al. Modified Gegen Qinlian decoction regulates Treg/Th17 balance to ameliorate dss-induced acute experimental colitis in mice by altering the gut microbiota [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 756978. doi: 10.3389/fphar.2021.756978.
- [5] 卫江鹏,刘刚,张霆,等. 溃疡性结肠炎患者肠道机械屏障变化与 STAT3 信号通路关系的研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2016, 25(1): 47-50.
- [6] 贾文秀,王冬,罗雨欣,等. 上皮间质转化在炎症性肠病相关肠纤维化中的作用[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2020, 29(6): 695-699.

- [7] 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.
- [8] 赵亚妮, 李瑶, 张妍, 等. 葡聚糖硫酸钠不同给药方式建立小鼠溃疡性结肠炎模型[J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(1):33-39.
- [9] 赵珊, 王鹏程, 王秋红, 等. 小鼠葡聚糖硫酸钠急性溃疡性结肠炎模型的建立和评价[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(2):42-45.
- [10] MURTHY SN, COOPER HS, SHIM H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin[J]. *Dig Dis Sci*, 1993, 38(9):1722-1734.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2006:1167-1170.
- [12] KIHARA N, DE LA FUENTE SG, FUJINO K, et al. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats[J]. *Gut*, 2003, 52(5):713-719.
- [13] 甄建华, 黄光瑞. 溃疡性结肠炎中医病名、病因、病机的古今比较和回顾[J]. *环球中医药*, 2019, 12(8):1286-1289.
- [14] 秦书敏, 张海燕, 吴皓萌, 等. 基于现代文献的溃疡性结肠炎证候及证素分布特点研究[J]. *环球中医药*, 2021, 14(3):389-394.
- [15] ANTONI L, NUDING S, WEHKAMP J, et al. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(5):1165-1179.
- [16] IVANOV AI. Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions[J]. *Front Biosci*, 2008, 13:6662-6681. doi: 10.2741/3180.
- [17] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Molec Cell Biol*, 2014, 15(3):178-196.
- [18] DONGRE A, WEINBERG RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2):69-84.
- [19] LOVISA S, GENOVESE G, DANESE S. Role of epithelial-to-mesenchymal transition in inflammatory bowel disease[J]. *J Crohns Colitis*, 2019, 13(5):659-668.
- [20] ACLOQUE H, ADAMS MS, FISHWICK K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1438-1449.
- [21] YANG J, ZHOU CZ, ZHU R, et al. MiR-200b-containing microvesicles attenuate experimental colitis associated intestinal fibrosis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(12):1966-1974.

Effects of Modified *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤) on Intestinal Mucosal Barrier and Epithelial Mesenchymal Transition in Ulcerative Colitis Model Mice

FANG Lihui^{1,2}, ZHANG Jiaqi², HU Lanshuo^{1,2}, WANG Xintong², LIU Shan², WANG Yuedan², HUANG Jinke², TANG Xudong²

1. Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Institute of Digestive Disease, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT **Objective** To investigate the possible mechanism of modified *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤) in treatment of ulcerative colitis (UC) from the view of intestinal mucosal epithelial barrier damage and epithelial mesenchymal transition. **Methods** Sixty male C57BL/6J mice were divided into blank group, model group, western medicine control group, and low-, medium-, and high-dose modified *Gegen Qinlian Decoction* groups, with 10 mice in each group. Except for the blank group, 3% dextran sodium sulfate (DSS) was used to induce colitis model by free drinking for 7 days, and on the first day of modelling, 6, 12, and 24 g/(kg·d) of modified *Gegen Qinlian Decoction* were given to the low-, medium-, and high-dose groups respectively, 5-aminosalicylic acid (5-ASA) 100 mg/(kg·d) given by gavage to western medicine control group, and 10 ml/kg distilled water were given to blank and model group by gavage, once a day for 7 days. Body mass of mice was recorded and disease activity index (DAI) scores were performed daily. The mice were anesthetized after 24h of the last administration and the colon was taken to observe the length of colon, HE staining was applied to observe the damage of colonic mucosa and score pathological states, Masson staining to detect the deposition of colonic collagen fibers, immunofluorescence to observe the distribution of F-actin in colonic mucosal epithelium, and immunohistochemistry to detect the expression of tight junction protein ZO-1, Occludin, E-cadherin and Vimentin. **Results** Compared with the blank group at the same time, the percentage of

body mass of mice in the model group on day 7 of modelling significantly reduced and the DAI score was significantly increased ($P < 0.01$); compared with the model group at the same time, the body mass of mice in the western medicine control group and all of modified *Gegen Qinlian Decoction* groups decreased, and the DAI scores of mice in the western medicine control group and the high-dose modified *Gegen Qinlian Decoction* group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with the same time of mice in the low-dose *Gegen Qinlian Decoction* group, the body mass of mice in the high-dose *Gegen Qinlian Decoction* group and the western medicine control group significantly elevated ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the length of the colon of mice in the model group was significantly shortened, the pathological score and the percentage of collagen area were significantly increased, the average fluorescence intensity of F-actin was reduced, the protein levels of ZO-1, Occludin and E-cadherin in the colon tissue decreased, and the protein level of Vimentin elevated ($P < 0.01$). Compared with the model group, the length of colon significantly increased, pathological score, collagen area percentage decreased, ZO-1, Occludin, E-cadherin protein levels increased and Vimentin levels decreased in all medicated groups; the average fluorescence intensity of F-actin increased in the western medicine control group and the middle- and high-dose *Gegen Qinlian Decoction* groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the low-dose *Gegen Qinlian Decoction* group, the proportion of collagen fibre area in the middle-dose *Gegen Qinlian Decoction* group and the western medicine control group reduced; the mean fluorescence intensity of F-actin increased in the middle-dose *Gegen Qinlian Decoction* group; the protein levels of ZO-1 and E-cadherin increased in the western medicine control group, and the protein levels of ZO-1 increased in the high-dose *Gegen Qinlian Decoction* group ($P < 0.05$). Compared with the medium-dose *Gegen Qinlian Decoction* group, the protein levels of ZO-1 elevated in the high-dose *Gegen Qinlian Decoction* group ($P < 0.05$). Compared with the high-dose *Gegen Qinlian Decoction* group, level of E-cadherin and Vimentin protein of the western medicine control group increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Modified *Gegen Qinlian Decoction* was able to reduce colonic inflammation and mucosal barrier damage and inhibit the process of epithelial mesenchymal transition in mice models of ulcerative colitis, which may be one of its action mechanisms.

Keywords ulcerative colitis; *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤); intestinal mucosal barrier; epithelial mesenchymal transition; disease activity index

(收稿日期: 2024-07-25; 修回日期: 2024-09-23)

[编辑: 邓媛]

广告

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001 年合订本每本 100 元, 2002、2003 年合订本每本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本, 每本 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期)每册 15 元, 2018 年(缺 5、7、9 期)每册 20 元, 2020 年(缺 7、8、9 期)每册 20 元, 2021 年每册 20 元。2022、2023 年每册 30 元。2011—2013 年合订本, 每年 4 本, 全年 280 元; 2014 年合订本, 共 4 本, 全年 400 元; 2018—2021 年合订本, 每年 4 本, 全年 600 元; 2022、2023 年合订本, 共 4 本, 全年 800 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信 (zyzzgzh) 购买。邮编: 100700, 电话: (010) 64089195。