

广藿香挥发油对感染后肠易激综合征模型大鼠结肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1、Occludin表达的影响[△]

刘 瑶^{1*}, 邓文辉², 刘 伟^{3#}(1.广东食品药品职业学院中医保健学院,广州 510520;2.广东省执业药师注册中心,广州 510080;3.东方药林药业有限公司,广州 510515)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2190-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.09

摘要 目的:研究广藿香挥发油对感染后肠易激综合征(PI-IBS)模型大鼠结肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1、Occludin表达的影响。方法:将大鼠随机分为正常对照组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)、马来酸曲美布汀片组(TMT,0.1 g/kg)和广藿香挥发油低、中、高剂量组[2、3、4 g(生药)/kg],每组8只。除正常对照组外,其余各组大鼠均采用结肠灌注乙酸法复制PI-IBS模型。造模成功后,每天ig给药1次,连续给药5 d。采用免疫组化法检测结肠黏膜中ZO-1、Occludin蛋白表达[以积分光密度(IOD)值反映]并分析其分布情况。结果:正常对照组大鼠ZO-1、Occludin蛋白均匀分布在肠上皮细胞的顶端,呈蜂窝状或呈点状聚集;模型组大鼠ZO-1、Occludin蛋白零散分布在肠上皮细胞的顶端,其染色分布不均或褪色;广藿香挥发油组大鼠ZO-1、Occludin蛋白分布类似正常对照组,但其染色浅于正常对照组。模型组大鼠ZO-1、Occludin蛋白的IOD值低于正常对照组($P<0.01$);广藿香挥发油高剂量组大鼠ZO-1、Occludin蛋白的IOD值,以及广藿香挥发油中剂量组、TMT组大鼠ZO-1蛋白的IOD值高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:广藿香挥发油可上调PI-IBS大鼠结肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1和Occludin的表达。

关键词 广藿香挥发油;感染后肠易激综合征;紧密连接蛋白;大鼠

Effects of Volatile Oil of *Pogostemon cablin* on the Expression of Tight Junction Protein ZO-1 and Occludin in Colonic Mucosal Epithelial Cells of Rats with Post-infectious Irritable Bowel Syndrome

LIU Yao¹, DENG Wenhui², LIU Wei³(1.School of TCM Healthcare, Guangdong Vocational College of Food and Drug, Guangzhou 510520, China; 2.Guangdong Registration Center of Licensed Pharmacist, Guangzhou 510080, China; 3.Orient Life Co., Ltd., Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of volatile oil of *Pogostemon cablin* on the expression of tight junction proteins ZO-1 and Occludin in colonic mucosal epithelial cells of rats with post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS). METHODS: Rats were randomly divided into normal control group (distilled water), model group (distilled water), Trimebutine maleate tablet group (TMT, 0.1 g/kg) and volatile oil of *P. cablin* low-dose, medium-dose and high-dose groups [2, 3, 4 g(crude drug)/kg] with 8 rats in each group. Except for normal control group, those groups were given colon perfusion of acetic acid to induce PI-IBS model. After modeling, they were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 5 days. The expression of ZO-1 and Occludin [by IOD] and their distribution were detected by immunohistochemistry. RESULTS: In normal control group, ZO-1 and Occludin evenly distributed on the top of enterocyte, manifesting as alveolate and punctiform; in model group, ZO-1 and Occludin scattered on the top of enterocyte, showing uneven dyeing or fade; the distribution of ZO-1 and Occludin in volatile oil of *P. cablin* groups was similar to normal control group, and its dyeing was lighter than that of normal control group. IOD value of ZO-1 and Occludin in model group were lower than in normal control group ($P<0.01$); those of volatile oil of *P. cablin* high-dose group and the IOD value of ZO-1 of *P. cablin* medium-dose group and TMT group were higher than those of model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: The volatile oil of *P. cablin* can up-regulate the expression of tight junction proteins ZO-1 and Occludin in colonic mucosal epithelial cells of rats with PI-IBS.

KEYWORDS Volatile oil of *P. cablin*; Post-infectious irritable bowel syndrome; Tight junction protein; Rat

肠易激综合征(Irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的胃肠道功能紊乱性疾病。在西方国家其发病率约为15%~20%,我国约为5%~10%,发病率呈逐年上升趋势^[1]。该病患

病率高、病程长、易反复、治疗困难,患者的生活质量受到严重影响。近年来研究发现,IBS的发病率在肠道感染后显著增加。患者被肠道病毒、细菌或寄生虫等感染,在病原体清除及黏膜炎症逐渐消退后,出现IBS症状,称之为感染后肠易激综合征(Post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)。PI-IBS以腹泻型IBS(D-IBS)多见,其比例可达70%以上^[2]。

PI-IBS的病因和发病机制迄今仍不明确。近年研究发现,其发病机制与持续的低度肠道炎症、结肠通透性增高、免疫机

[△] 基金项目:广东省中医药局科研项目(No.20131279)

* 副主任中药师,博士。研究方向:复方药理学。电话:020-29164605。E-mail:liuyao5051@sina.com

通信作者:副主任中药师,博士。研究方向:新药研发。电话:020-66222782。E-mail:89135352@qq.com

制的异常等密切相关^[3]。低度肠道炎症可引起肠上皮细胞的机械屏障功能及紧密连接(Tight junction, TJ)结构损害。紧密连接结构由多种蛋白组成,其中ZO-1、Occludin蛋白对维持肠正常的结构和功能起着至关重要的作用。

据临床报道,藿香正气制剂对D-IBS具有确切的临床疗效^[4-5]。笔者前期研究已证实,藿香正气口服液对PI-IBS大鼠肠黏膜机械屏障具有保护和修复作用^[6]。广藿香挥发油是藿香正气口服液的主药之一,现代药理研究表明,其具有良好的抗菌、协调胃肠运动及保护肠屏障的作用^[7]。目前,国内外关于广藿香挥发油治疗IBS的实验研究集中于对D-IBS模型动物的胃肠激素、胃肠动力、水液代谢的调控机制方面^[8],尚未见广藿香挥发油对PI-IBS肠黏膜屏障功能的保护作用的研究报道。因此,本课题拟通过观察广藿香挥发油对PI-IBS大鼠结肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1和Occludin表达的影响,探讨其对PI-IBS大鼠肠黏膜机械屏障的保护作用及其机制,为其用于治疗PI-IBS提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

IX71多功能倒置电子显微镜(日本Olympus公司);RM-2135生物组织包埋机(德国Leica公司);RMZ135石蜡切片机(德国Meidx公司)。

1.2 药材、药品与试剂

广藿香购自广东阳春广藿香种植基地,经成都中医药大学峨眉学院刘晓春副教授鉴定为真品;马来酸曲美布汀片(TMT,开开援生制药股份有限公司,批号:13032817,规格:每片0.1g);乙酸、水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);兔抗Occludin、ZO-1多克隆抗体(美国Millipore公司,批号:2612251、2188554);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)(美国CST公司,批号:7074P2);浓缩型二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(武汉博士德生物公司,批号:135911B)。

1.3 动物

健康成年SD大鼠48只,SPF级,♂,2月龄,体质量(250±20)g,购自南方医科大学实验动物中心[动物合格证号:SCXK(粤)2011-0015]。摄食饲料为南方医科大学实验动物中心提供的混合饲料,适应性喂养3d后进行实验。所有大鼠都在安静、室温(18~20℃)、自然光线、昼夜循环(12h/12h)的条件下饲养。

2 方法

2.1 广藿香挥发油的提取

采用蒸馏法进行提取,得到提取物浓度为4g(生药)/100g(原液),其中广藿香挥发油的含量为43%。

2.2 造模

采用结肠灌注乙酸法复制PI-IBS大鼠模型。大鼠于造模前12h禁食、自由饮水。造模前用吸入乙醚法麻醉,提起鼠尾,使肛门暴露;经肛门插入导尿管,距肛门8cm,结肠内灌注40%乙酸1ml,保留30s;然后用0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)1ml冲洗结肠,缓慢拔出灌肠管,恢复6d,复制PI-IBS大鼠模型。

2.3 分组与给药

将48只大鼠随机分为正常对照组、模型组、TMT组(0.1g/kg,临床成人用量的10倍剂量)和广藿香挥发油低、中、高剂

量组[2、3、4g(生药)/kg,根据前期药效学试验的有效剂量确定],每组8只。除正常对照组外,其余各组大鼠均按“2.2”项下方法复制PI-IBS模型。造模成功后,各给药组大鼠ig相应药物,正常对照组和模型组大鼠ig等体积蒸馏水,每天1次,连续5d。

2.4 结肠组织采集

末次给药24h后,10%水合氯醛麻醉大鼠。开腹迅速剖取结肠,纵向剪开肠腔,迅速用冷生理盐水冲洗干净。取1~2cm结肠组织,置于4%多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,用于ZO-1和Occludin蛋白的免疫组化检测。

2.5 指标检测

2.5.1 一般情况与体质量 实验期间观察大鼠的精神状态、活动、皮毛光泽度、体质量、饮食、粪便性状、存活等一般情况。在造模前(实验第1天)、造模结束后(实验第7天)、给药结束后(实验第12天)分别测定各组大鼠的体质量。

2.5.2 大便含水量 在造模结束后(实验第7天)、给药结束后(实验第12天)分别测定各组大鼠的大便含水量。各组大鼠禁食12h,束缚动物前肢运动3h,收集每只大鼠应激期的大便,称定大便湿质量,然后烘干称定大便干质量,计算大便含水量:大便含水量(%)=(大便湿质量-大便干质量)/大便湿质量×100%。

2.5.3 ZO-1、Occludin蛋白的表达 采取经典的免疫组织化学染色法(SABC法),将固定好的石蜡切片常规脱蜡、脱水;每张切片滴加过氧化氢(H₂O₂)溶液,室温放置10min;将组织切片浸入组织抗原修复液(0.01mol/L枸橼酸钠溶液,pH=6.0)中,然后置于微波炉内进行抗原热修复;自然冷却至室温,滴加5%牛血清白蛋白(BSA)封闭液,室温孵育20min;滴加兔抗ZO-1、Occludin多克隆抗体(1:200),4℃过夜,37℃孵育2h;滴加HRP标记山羊抗小鼠IgG(1:200),4℃过夜,PBS洗3次,每次3min;DAB显色,倒置电子显微镜下观察蛋白阳性表达。

切片观察及结果判定:ZO-1、Occludin蛋白主要表达于大鼠结肠黏膜上皮细胞。阳性表达为胞膜和(或)胞质内呈现棕黄色或棕褐色颗粒,颜色越深即表达越强;未出现棕黄色、棕褐色颗粒为阴性细胞。每一组随机选择8张染色清晰的切片,每张切片于40倍显微镜下随机选取1个视野,并在高倍(400倍)镜下观察阳性颗粒在细胞内的分布。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,测定各切片中阳性细胞的积分光密度(IOD),取其平均值作为该组ZO-1、Occludin蛋白的相对含量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行分析。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐性时组间两两比较采用LSD检验;方差不齐时,以Welch法校正后采用Games-Howell检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况观察结果

造模期间,造模大鼠在造模当天开始即出现精神萎靡、反应迟钝、稀便、食量减少、肛周污秽的现象。造模第1~3天,大鼠体质量下降、毛色晦暗无光泽且被粪便沾染、持续稀便,个别大鼠有血便。自造模第4天开始,大鼠毛发光泽度及精神状态均有不同程度好转,大便仍为稀便。造模第7天,与正常对照组比较,其余各组大鼠活动欠佳,皮毛欠光泽,大便稀软、成

形或半成形。

给药期间,广藿香挥发油低、中剂量组大鼠症状缓解较慢,毛色仍稍显晦暗,不活跃、食量偏少,仍存在稀便的症状;广藿香挥发油高剂量组大鼠随着给药时间的延长,症状逐渐好转,大部分大鼠稀烂大便逐渐成形,粪便呈灰褐色颗粒状,毛色渐有光泽,进食量增加并接近正常,活动增多;模型组大鼠有的直至处死前仍有稀便或半稀便症状;TMT组大鼠的稀便症状消失,但精神状态、毛色光泽度、饮水量均不及正常对照组。上述结果提示,广藿香挥发油可以改善PI-IBS模型大鼠的一般情况。

3.2 各组大鼠体质量的测定结果

造模前,各组大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。造模结束后,模型组和各给药组大鼠体质量均低于正常对照组($P<0.05$)。给药结束后,模型组及各给药组大鼠体质量低于正常对照组($P<0.01$);广藿香挥发油高剂量组和TMT组大鼠体质量高于模型组($P<0.05$),但两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠不同时期体质量的测定结果见表1。

表1 各组大鼠不同时期体质量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8, g$)

Tab 1 Results of body weight of rats in each group at different period ($\bar{x} \pm s, n=8, g$)

组别	剂量, g/kg	造模前	造模结束后	给药结束后
正常对照组		250.63 ± 6.95	265.63 ± 6.91	278.88 ± 4.49
模型组		255.25 ± 6.23	260.50 ± 5.93*	267.63 ± 3.93**
TMT组	0.1	251.50 ± 4.57	258.38 ± 3.07*	272.00 ± 3.34***
广藿香挥发油低剂量组	2	252.50 ± 6.21	259.13 ± 4.88*	269.50 ± 3.02**
广藿香挥发油中剂量组	3	254.00 ± 6.04	259.88 ± 6.01*	269.25 ± 3.69**
广藿香挥发油高剂量组	4	253.88 ± 4.39	258.87 ± 4.38*	271.63 ± 4.66***

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$

3.3 各组大鼠大便含水量的测定结果

造模结束后,模型组和各给药组大鼠大便含水量均高于正常对照组($P<0.01$)。给药结束后,模型组和各给药组大鼠大便含水量仍高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);TMT组、广藿香挥发油中、高剂量组大鼠的大便含水量均明显低于模型组($P<0.01$)。各组大鼠不同时期大便含水量的测定结果见表2。

表2 各组大鼠不同时期大便含水量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

Tab 2 Results of water content in rats' faeces in each group at different period ($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	造模结束后	给药结束后
正常对照组	48.12 ± 3.75	46.88 ± 3.51
模型组	65.25 ± 4.39**	59.11 ± 5.34**
TMT组	63.56 ± 4.44**	52.44 ± 3.69**
广藿香挥发油低剂量组	64.63 ± 3.40**	55.03 ± 3.34**
广藿香挥发油中剂量组	62.59 ± 4.68**	51.98 ± 4.34**
广藿香挥发油高剂量组	64.15 ± 3.49**	51.74 ± 4.21**

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.01$

3.4 ZO-1、Occludin 蛋白表达的测定结果

正常对照组大鼠ZO-1、Occludin蛋白均匀分布在肠上皮细胞的顶端,呈蜂窝状或呈点状聚集;模型组大鼠结肠黏膜组织中ZO-1、Occludin蛋白零散分布在肠上皮细胞的顶端,其染色分布不均或褪色;模型组大鼠ZO-1、Occludin蛋白IOD值低于正常对照组($P<0.01$);广藿香挥发油中、高剂量组和TMT组大鼠ZO-1蛋白IOD值高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中广藿香挥发油高剂量组ZO-1蛋白IOD值与正常对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$);广藿香挥发油高剂量组大鼠Occludin蛋白IOD值高于模型组($P<0.01$),且与正常对照组大鼠之间差异无统计学意义($P>0.05$);TMT组大鼠Occludin蛋白IOD值与模型组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠结肠黏膜ZO-1、Occludin蛋白表达切片图见图1、图2,测定结果见表3。

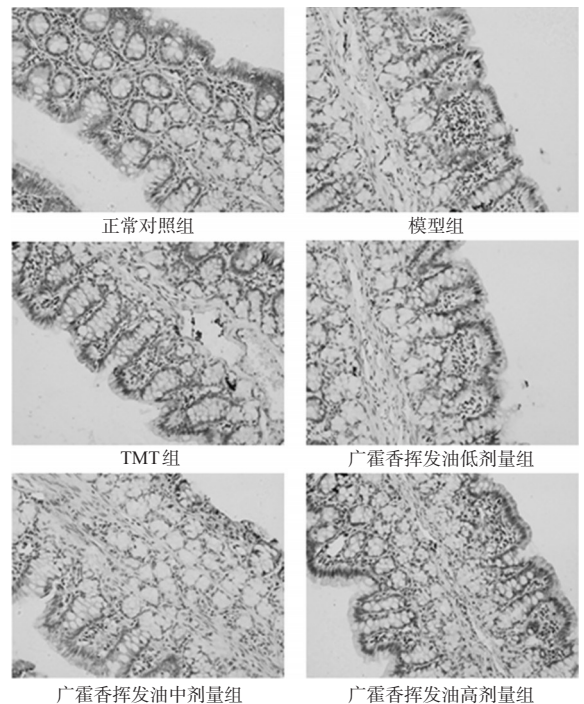


图1 各组大鼠结肠黏膜ZO-1蛋白表达切片图($\times 400$)

Fig 1 Slice map of ZO-1 protein in colonic mucosa of rats in each group ($\times 400$)

4 讨论

PI-IBS的主要临床症状表现为腹痛或腹部不适、排便次数增加、稀便、黏液便、排便紧迫感等,属中医学“腹痛”“泄泻”“下利”等范畴。肠道炎症(尤其是急性胃肠炎)后持续存在的低度炎症可破坏肠黏膜上皮屏障功能,增加其通透性,引起水钠吸收障碍而产生腹泻^[9]。肠黏膜上皮细胞是肠黏膜屏障的主要组织结构基础,紧密连接是相邻上皮细胞间最重要的连接方式。紧密连接结构位于上皮细胞间的顶端,可以在细胞侧空间形成调控屏障,调节水、离子和大分子物质的跨膜转运,防止大分子物质经肠腔“漏”到周围组织中,起到减轻肠黏膜通透性及维护屏障功能的作用。多种蛋白质参与紧密连接的形成,主要包括ZO蛋白家族、Occludin蛋白、Claudin蛋白和连接黏附分子等。紧密连接蛋白在上皮细胞的表达水平不仅可以反映肠道屏障的破坏程度,同时也可反映肠道屏障的恢

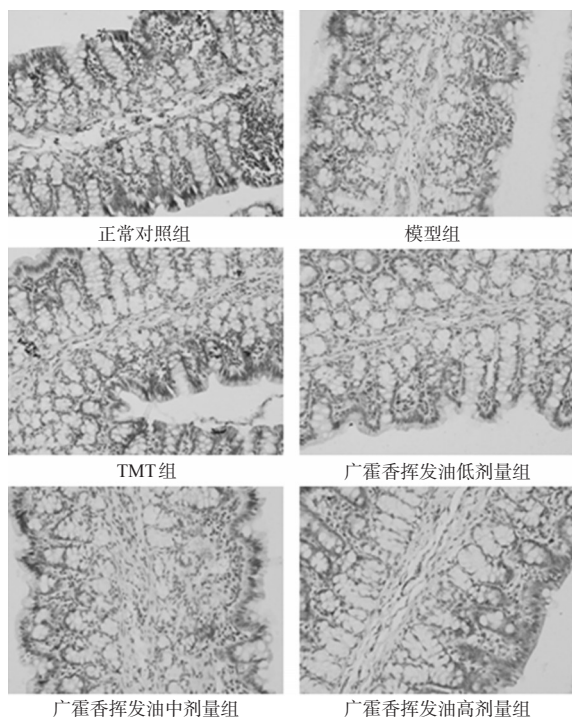


图2 各组大鼠结肠黏膜Occludin蛋白表达切片图(×400)

Fig 2 Slice map of Occludin protein in colonic mucosa of rats in each group(×400)

表3 各组大鼠结肠黏膜ZO-1、Occludin蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Expression results of ZO-1 and Occludin protein in colonic mucosa of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ZO-1	Occludin
正常对照组	183 821.43 ± 67 149.53	162 800.12 ± 36 626.83
模型组	85 791.36 ± 24 789.43**	89 346.88 ± 14 597.52**
TMT组	135 937.29 ± 44 797.15**	124 326.73 ± 51 119.36*
广藿香挥发油低剂量组	125 330.18 ± 30 020.24**	115 565.06 ± 28 167.51*
广藿香挥发油中剂量组	141 596.45 ± 41 448.98**	122 051.91 ± 29 419.66*
广藿香挥发油高剂量组	161 713.83 ± 34 917.79**	138 475.54 ± 39 763.16**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

复程度。

PI-IBS作为IBS的一种亚型,目前并无特异性的治疗方法,主要参照D-IBS实施治疗方案。治疗D-IBS的常用药物主要是通过作用于中枢或外周神经系统,改善胃肠道动力和内脏敏感性^[10]。基于PI-IBS的病理生理学特征与持续的低度肠道炎症、结肠通透性增高、菌群失调密切相关,抗菌药物、微生物生态治疗PI-IBS逐渐得到重视,然其有效性目前仍有争议,有待进一步评估。TMT是胃肠运动的调节剂,临床用于治疗IBS已逾40年,应用广泛,故本文选其作为阳性对照药物。TMT

虽对IBS患者常见的腹痛、腹部不适、便秘、腹泻等症状均具有较好疗效,但其仅局限于改善症状,且停药后症状易复发^[11-12]。

本实验免疫组化分析结果显示,模型组大鼠ZO-1和Occludin蛋白IOD值均显著低于正常对照组($P < 0.01$)。经给予广藿香挥发油后,大鼠结肠黏膜中ZO-1和Occludin蛋白表达不同程度地增强,其中广藿香挥发油高剂量组大鼠ZO-1、Occludin蛋白IOD值均明显高于模型组($P < 0.01$),且与正常对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验结果提示,PI-IBS模型大鼠存在肠黏膜上皮细胞紧密连接损伤,表现为ZO-1、Occludin蛋白表达水平降低;广藿香挥发油可通过增强PI-IBS模型大鼠结肠黏膜上皮细胞ZO-1、Occludin蛋白的表达,修复肠黏膜紧密连接结构,从而保护肠黏膜机械屏障。

参考文献

- [1] Chang FY, Lu CL. Irritable bowel syndrome in the 21st century: perspectives from Asia or South-east Asia[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(1):4.
- [2] 肖海刚,郭津生.细菌性痢疾与肠易激综合征相关性分析[J].*世界华人消化杂志*, 2006, 14(10):1 012.
- [3] 曾娟.肠易激综合征肠黏膜屏障功能的研究[D].济南:山东大学,2008.
- [4] 吕丹杨.藿香正气胶胶囊治疗肠易激综合征58例临床观察[J].*浙江中医杂志*, 2004, 39(7):308.
- [5] 邱国海,唐荣德.加味广藿香挥发油散联合西药治疗腹泻型肠易激综合征临床研究[J].*新中医*, 2011, 43(3):31.
- [6] 刘瑶.藿香正气液对感染后肠易激综合征大鼠肠黏膜屏障的保护和调节作用研究[D].广州:南方医科大学,2014.
- [7] 谢肄聪,唐方.广藿香挥发油对肠屏障功能的保护作用[J].*中草药*, 2009, 40(6):942.
- [8] 吕妍.芳香化湿法及代表方药对D-IBS模型鼠肠动力、水液代谢及相关胃肠激素调控机理研究[D].天津:天津医科大学,2009.
- [9] Piche T, Barbara G, Aubert P, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators[J]. *Gut*, 2009, 58(2):196.
- [10] 赵鑫鑫,黄文龙,钱海,等.肠易激综合征治疗药物的研究进展[J].*中国药科大学学报*, 2011, 42(2):182.
- [11] 陈凯.马来酸曲美布汀治疗肠易激综合征疗效观察[J].*河北医学*, 2009, 15(7):815.
- [12] 廖辉燕,古赛.曲美布汀及双歧三联活菌联合抗焦虑抑郁药治疗难治性腹泻型肠易激综合征的疗效观察[J].*中国药房*, 2014, 25(14):1 293.

(收稿日期:2015-09-01 修回日期:2015-11-16)

(编辑:林 静)