

# 术苓健脾胶囊对TNBS诱导的大鼠实验性结肠炎的作用及机制

周梓琪<sup>1</sup>, 李 剑<sup>2</sup>, 刘 丹<sup>1</sup>, 吴 洁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198; <sup>2</sup>金陵药业股份有限公司, 南京 210009)

**摘 要** 探讨术苓健脾胶囊(术苓)对2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠实验性结肠炎的作用及其机制。采用2.5% TNBS灌肠制备大鼠实验性结肠炎模型。将大鼠随机分为正常组、模型组、肠炎宁(180 mg/kg)组以及术苓低剂量(40 mg/kg)、高剂量(120 mg/kg)组。造模后药物治疗7 d后处死大鼠。其间每日记录大鼠体重,观察大鼠疾病活动状态。实验结束后,取结肠组织进行HE病理学分析、检测结肠组织中髓过氧化物酶(MPO)酶活、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、炎性细胞因子(IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10)及紧密连接蛋白(occludin、ZO-1)的表达水平,并检测血清中炎性细胞因子(IL-6、IL-1 $\beta$ )的含量。结果表明,与模型组相比,术苓给药显著缓解了TNBS造模引起的体重下降、疾病活动指数(DAI)升高,缓解了结肠组织的缩短、水肿以及病理学损伤,减少了炎性细胞浸润、隐窝的破坏与杯状细胞的丢失,降低了结肠组织MPO酶活性、iNOS与炎性细胞因子的水平,增加了结肠紧密连接蛋白的表达,同时降低了血清中的炎性因子的含量。结果表明,术苓通过降低炎性因子水平,增加肠道紧密连接蛋白的表达,改善TNBS诱导的大鼠实验性结肠炎。本研究为术苓的临床应用提供了理论依据。

**关键词** 术苓健脾胶囊; 中药复方; 2,4,6-三硝基苯磺酸; 结肠炎

**中图分类号** R967 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2023)01-0107-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220923002

引用本文 周梓琪, 李剑, 刘丹, 等. 术苓健脾胶囊对TNBS诱导的大鼠实验性结肠炎的作用及机制[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(1): 107 - 114.

Cite this article as: ZHOU Ziqi, LI Jian, LIU Dan, *et al.* Pharmacodynamics and mechanism of Zhuling Jianpi capsule on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(1): 107 - 114.

## Pharmacodynamics and mechanism of Zhuling Jianpi capsule on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats

ZHOU Ziqi<sup>1</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, LIU Dan<sup>1</sup>, WU Jie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

<sup>2</sup>Jinling Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210009, China

**Abstract** To investigate the pharmacodynamic effects and mechanism of Zhuling Jianpi capsule(Zhuling) on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced experimental colitis in rats. The experimental colitis model was established by enema with 2.5% TNBS. The rats were randomly divided into normal group, model group, Changyanning (180 mg/kg) group and Zhuling low-dose (40 mg/kg) group and Zhuling high-dose (120 mg/kg) group. After modeling, the rats were executed after 7 days of drug treatment. During this period, the disease activity status of the rats was observed, and the body weights of the rats were recorded daily. At the end of the experiment, the colonic tissues were obtained for the analysis of the expression of hematoxylin-eosin(HE) staining. The myeloperoxidase (MPO) enzyme activity, mRNA expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10) were determined, and the levels of intestinal tight junction proteins and serum inflammatory factor levels were measured. The results showed that compared with model group, the administration of Zhuling significantly alleviated the weight loss and elevated the disease activity index (DAI)

收稿日期 2022-09-23 \* 通信作者 Tel: 025-86185386 E-mail: wujie@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81973224)

caused by TNBS, relieved the shortening, edema and pathological damage of colonic tissue, reduced inflammatory cell infiltration, destruction of crypt and loss of goblet cells, decreased the MPO enzyme activity of colonic tissue, iNOS and pro-inflammatory cytokines in colon, increased the levels of colonic tight junction protein (occludin, ZO-1), and decreased serum levels of inflammatory factors (IL-6, IL-1 $\beta$ ). The results suggest that *Zhuling* administration ameliorates TNBS-induced experimental colitis in rats by decreasing the level of inflammatory factors and increasing the expression of intestinal tight junction proteins. This experiment could provide a theoretical basis for the clinical application of *Zhuling*.

**Key words** *Zhuling Jianpi* capsule; Chinese herbal compound; 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid; colitis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81973224)

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)影响着全球数百万人的生活<sup>[1]</sup>。由于肠屏障功能障碍和肠上皮细胞中的紧密连接受损, IBD可能由消化道慢性炎症状态逐渐发展为结肠癌<sup>[2]</sup>。IBD可以分为溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)两种, 通常伴有不同程度的肠道炎症和肠道黏膜损伤, 表现为肠道微生物菌群紊乱, 肠道免疫系统持续激活与炎症反应等<sup>[3]</sup>。目前临床上治疗IBD的主要药物为氨基水杨酸盐类和糖皮质激素类, 但存在易复发, 不良反应明显等缺点<sup>[4]</sup>。因此迫切需要寻找不良反应小, 疗效显著的药物用于临床治疗。

中药作用温和, 对IBD的治疗表现出独特的抗炎能力和疗效<sup>[5]</sup>。根据中医理论, IBD的临床表现可分为“腹泻”“痢疾”或“腹痛”等<sup>[6]</sup>。中药复方制剂由多种中药组成, 往往通过多靶点来发挥治疗作用, 在IBD的临床治疗中有广泛应用<sup>[7]</sup>。例如, 参苓白术散方剂是由十味治疗脾胃虚弱的草药组成的经典复方制剂, 可通过促进大鼠结肠中抗炎因子的表达, 增强免疫反应缓解结肠炎<sup>[8]</sup>。黄芩汤由四味中草药组成, 可以恢复结肠炎小鼠肠道微生物群的多样性, 并改善肠上皮细胞屏障<sup>[9]</sup>。除此以外, 大黄芍药汤、加味芍药汤、理中汤、四逆汤等经典方剂也逐渐应用于结肠炎的现代临床治疗, 这表明中医药在治疗结肠炎中发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。

本研究对象术苓健脾胶囊(简称术苓)是由骨碎补、黄柏、白芍、白术、一枝黄花、乌药、党参、铁苋菜、厚朴、茯苓、泽泻、防风、薏苡仁、大黄、桂枝、陈皮、槟榔、甘草等十八味中药组成的中药制剂。该方是在宋代官修方书《太平惠民和剂局方》中的“参苓白术散”的基础上加减化裁而来, 具有健脾

益肾、理气、化湿、清热的功效, 临床上可以用于健脾补肾, 治疗腹痛、腹泻等胃肠道疾病。基于“参苓白术散”的方解以及参考术苓的现行标准——国家食品药品监督管理局标准, 并综合方中各味药的用量和功效, 初步将骨碎补、党参、白术、茯苓、陈皮、白芍、薏苡仁、泽泻、黄柏定为方中君臣药。方中骨碎补肾强骨, 用量最大是为君药, 党参、白术、茯苓益气健脾渗湿同为君药, 配伍陈皮、白芍助君药以健脾益气, 兼能止泻; 并用薏苡仁、泽泻、黄柏助白术、茯苓健脾渗湿, 均为臣药。术苓散药性平和、温而不燥, 是治疗脾虚湿盛泄泻的常用方。但是术苓对于IBD的治疗作用及其分子机制仍有待进一步的研究。

目前人类已经开发多种与人类IBD症状、形态和组织病理学相似的结肠炎动物模型。其中, 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)与宿主蛋白结合后会引发机体抗原-抗体反应, 导致透壁结肠炎, 该模型症状、组织学改变以及T细胞免疫反应与CD更加类似, 故多用于CD的研究<sup>[11]</sup>。本研究通过使用2.5% TNBS灌肠构建大鼠结肠炎模型, 然后经口灌胃术苓, 观察其对大鼠结肠炎的治疗作用, 并进一步探讨可能的分子机制, 为术苓的临床用药提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

术苓健脾胶囊(国药准字Z20140001, 每粒0.27 g, 金陵药业股份有限公司); 肠炎宁片(国药准字Z36020518, 每片0.42 g, 江西康恩贝中药有限公司); TNBS(美国Sigma公司); 水合氯醛(上海凌峰化学试剂有限公司); 粪便隐血试剂盒(北京雷根生物技术有限公司); TMB显色液、RIPA裂解

液和 BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);大鼠血清 IL-6、IL-1 $\beta$  定量 ELISA 试剂盒(江苏雨桐生物科技有限公司);RNA 样品稳定剂、Pro RNA 提取试剂、Evo M-MLV 反转录试剂盒和 SYBR Green(湖南艾科瑞生物工程有限公司);4%多聚甲醛(国药集团药业股份有限公司);Tubulin 抗体、occludin 抗体与兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司);ZO-1 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

## 1.2 仪器

超纯水仪(中国力康生物医疗科技控股有限公司);SPARK 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);7300Plus 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司);K960 PCR 热循环仪(中国力康生物医疗科技控股有限公司);PCR 基因扩增仪(中国杭州晶格科学仪器有限公司)。

## 1.3 动物

雄性 SD 大鼠, SPF 级, 50 只, 6~8 周龄(体重  $180 \pm 10$  g), 购于上海市计划生育科学研究所, 实验动物合格证编号: No. 20180006026499。动物均饲养于中国药科大学动物实验中心清洁级环境中, 实验动物操作均符合中国药科大学实验动物福利伦理审查委员会标准。

# 2 方法

## 2.1 动物分组与给药

50 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 随机分为 5 组: 对照组、模型组、肠炎宁(180 mg/kg)组、术苓低剂量(40 mg/kg)组、术苓高剂量(120 mg/kg)组, 每组 10 只。大鼠造模前禁食不禁饮 24 h, 腹腔注射 7% 水合氯醛麻醉(300 mg/kg), 液体石蜡润滑肛门管(直径 2 mm)后, 伸入距离大鼠肛门 8 cm 处, 除对照组灌注生理盐水外, 其余各组均缓缓推入 5%TNBS 与无水乙醇按 2:1 体积比混合的造模剂(150 mg/kg)。大鼠倒置 10 min 后转移鼠笼内, 等待其自然苏醒。造模当天根据分组灌胃不同剂量的药物治疗, 治疗与造模同步, 持续 7 d。

## 2.2 体重、疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分监测

每日观察动物疾病活动状态, 称量体重, 观察粪便性状及便血情况, 粪便隐血试剂盒检测有无隐血。参考文献[12]进行 DAI 评分, 根据小鼠性

状特征(体重变化率、粪便性状和是否便血)变化, 由轻及重评为 0~4 分,  $DAI = (\text{体重变化率} + \text{粪便性状} + \text{是否便血})/3$ 。

## 2.3 结肠组织病理学检查

取动物结肠组织, 采用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 随后进行石蜡包埋、切片及苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 使用倒置显微镜观察拍照后。参照文献[13]进行组织病理学评分, 根据结肠组织病变程度(炎症情况、病变深度、隐窝破坏和病变范围), 由轻及重评为 0~4 分, 最终组织病理学评分为 4 项之和。

## 2.4 结肠髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性检测

取结肠组织称重, 每 10 mg 组织加入生理盐水 100  $\mu$ L, 在冰中用电动组织研磨器研磨得到结肠组织匀浆, 12 000 r/min 离心 10 min(4  $^{\circ}$ C)后得结肠匀浆上清液。取结肠匀浆上清液 10  $\mu$ L, 加入 96 孔板中, 按照 TMB 显色液说明书指示, 加 TMB 显色液 50  $\mu$ L, 空白对照孔中不加样品, 其余步骤相同。在室温下反应 5 min。再加入浓硫酸终止液 50  $\mu$ L 终止反应。使用酶标仪测 450 nm 处的吸收度,  $MPO \text{ 相对酶活 (U/g)} = (\text{样品孔测定吸收度} - \text{空白对照孔吸收度})/\text{取样量 (g)}$ 。随后进行统计学分析。

## 2.5 RT-PCR 检测炎症因子的表达

取小段结肠组织(于 RNA 样品稳定剂中保存), 根据 RNA 提取试剂盒进行操作提取组织 RNA, 酶标仪检测 RNA 浓度, 采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转为 cDNA, RT-qPCR 检测结肠组织中的炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IFN- $\gamma$ 、iNOS 的 RNA 表达水平变化。实时荧光定量 PCR 仪调节参数:  $94^{\circ}\text{C} \rightarrow 3 \text{ min}; 94^{\circ}\text{C} \rightarrow 5 \text{ s}; \text{退火温度 } 60^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ s} (40 \text{ 个循环})$ 。实验结果按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行计算, 以 GAPDH 表达水平对其结果标准化。引物序列下表 1 所示。

## 2.6 Western blot 检测结肠紧密连接蛋白的表达

取适量结肠组织, 加入预冷的 RIPA 裂解液, 在冰中用高速低温组织研磨仪充分研磨后, 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min, 4  $^{\circ}$ C, 离心 10 min, 吸取上清液, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒的说明操作检测蛋白含量。使用 12% SDS-PAGE 进行蛋白质的分离, 随后转移到 PVDF 膜上。转膜后使用 5% 脱



**Table 1** Sequences of RT-PCR primers

Gene		Primer sequences (5'→3')
GAPDH	Forward	CAAGTTCAACGGCACAGTCAAG
	Reverse	ACATACTCAGCACCAGCATCAC
IL-6	Forward	TCTGCTCTGGTCTTCTGGACT
	Reverse	GCATTGGAAGTTGGGCTAGGA
IL-1 $\beta$	Forward	CCTATGTCTTGCCCGTGGAG
	Reverse	TCCTGGGGAAGGCATTAGGA
IL-10	Forward	AATTGAACCACCGGCATCT
	Reverse	TTTCCAAGGAGTTGCTCCCG
IFN- $\gamma$	Forward	CATCGCCAAGTTCGAGGTGA
	Reverse	CACCGACTCCTTTTCCGCTT
iNOS	Forward	TGCTTCTGTGCTAATGCGGA
	Reverse	CGCTTCCGACTTTCCTGTCT

脂牛奶室温封闭1 h,一抗(ZO-1,1:1 000;occludin,1:1 000;Tublin,1:2 000)4 °C孵育过夜,HRP标记的二抗室温孵育1 h,加入适量ECL曝光液曝光。使用Image J进行灰度分析。

## 2.7 血清ELISA检测

血清于5 000 r/min,4 °C,离心5 min后收集上清液。根据ELISA试剂盒说明书测定IL-6、IL-1 $\beta$ 。简言之,将待测样品加入样品孔,在37 °C培养箱中孵育20 min,洗涤液洗涤5次,每孔加入酶标抗体,37 °C孵育30 min,洗涤液洗涤,重复5次,拍干;在

样品孔中加入显色剂A、B,盖上覆膜,轻轻振荡混匀,37 °C避光孵育10 min;加入终止液,终止反应,立即用酶标仪测定450 nm处的吸收度。根据标准品浓度对应吸收度制作标准曲线,并根据样品吸收度计算样品相应浓度。

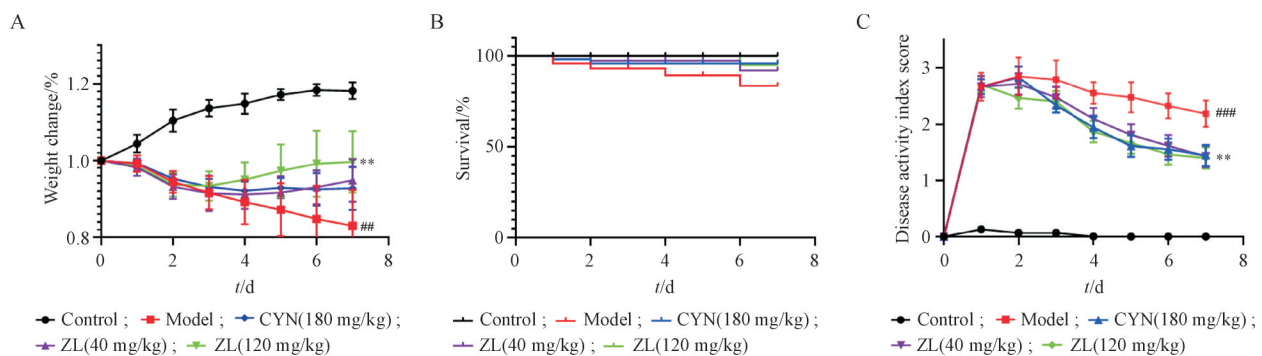
## 2.8 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。组别之间的显著性差异分析采用One-Way ANOVA 检验,组内两两数据比较进行LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 术苓对结肠炎大鼠疾病表征的影响

与对照组相比,模型组大鼠体重显著下降( $P < 0.05$ ),并出现精神萎靡、毛色暗淡、倦怠懒动等症状,而术苓与肠炎宁给药治疗以后,体重变化率呈现出了上升的趋势,其中术苓高剂量组体重显著增加( $P < 0.05$ ,图1-A),精神状态改善;与模型组相比,术苓与肠炎宁给药降低了大鼠的死亡率(图1-B)。DAI评分是反映结肠炎严重程度的重要指标。与对照组相比,模型组DAI评分显著升高( $P < 0.05$ ),而术苓与肠炎宁给药显著降低了DAI评分( $P < 0.05$ ,图1-C)。



**Figure 1** Effect of Zhuling Jianpi capsule (ZL) on disease characterization of colitis rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

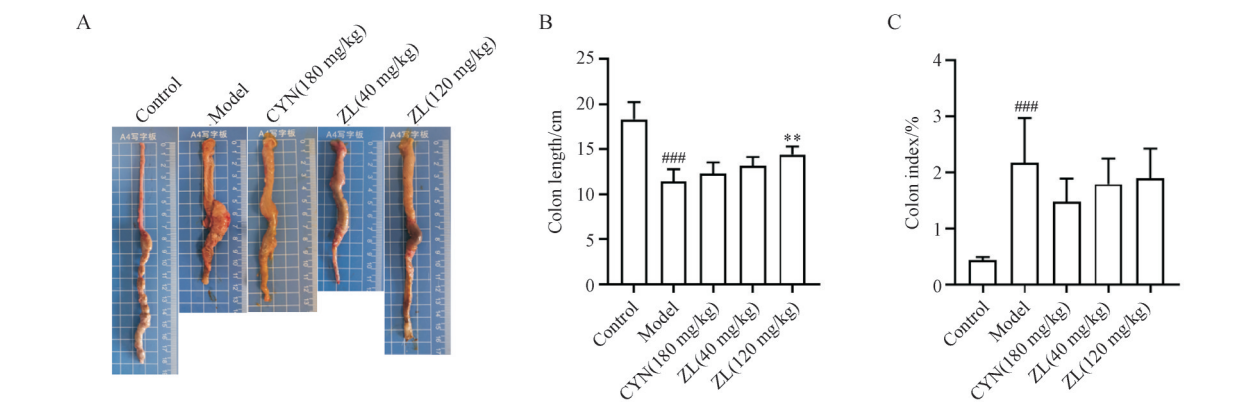
A: Body weight change; B: Survival rate; C: Disease activity index (DAI). CYN: Changyanning tablet

## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

### 3.2 术苓对结肠炎大鼠结肠组织病理学的影响

大鼠结肠照片如图2-A所示,对照组大鼠的肠壁纹理清晰,不增厚,肠道无粘连,而模型组结肠出现充血,肠壁增厚,肠道之间或结肠与周围组织例如与腹膜组织等严重粘连,且有粪便堆积,术苓与肠炎宁给药后水肿症状得到缓解;与对照组相

比,模型组结肠长度显著缩短( $P < 0.05$ ),而术苓给药呈剂量依赖性显著增加了结肠长度( $P < 0.05$ ,图2-B)。结肠指数反映了结肠水肿程度。与对照组相比,模型组结肠水肿程度显著增加( $P < 0.05$ ),而术苓与肠炎宁给药后缓解了结肠水肿。



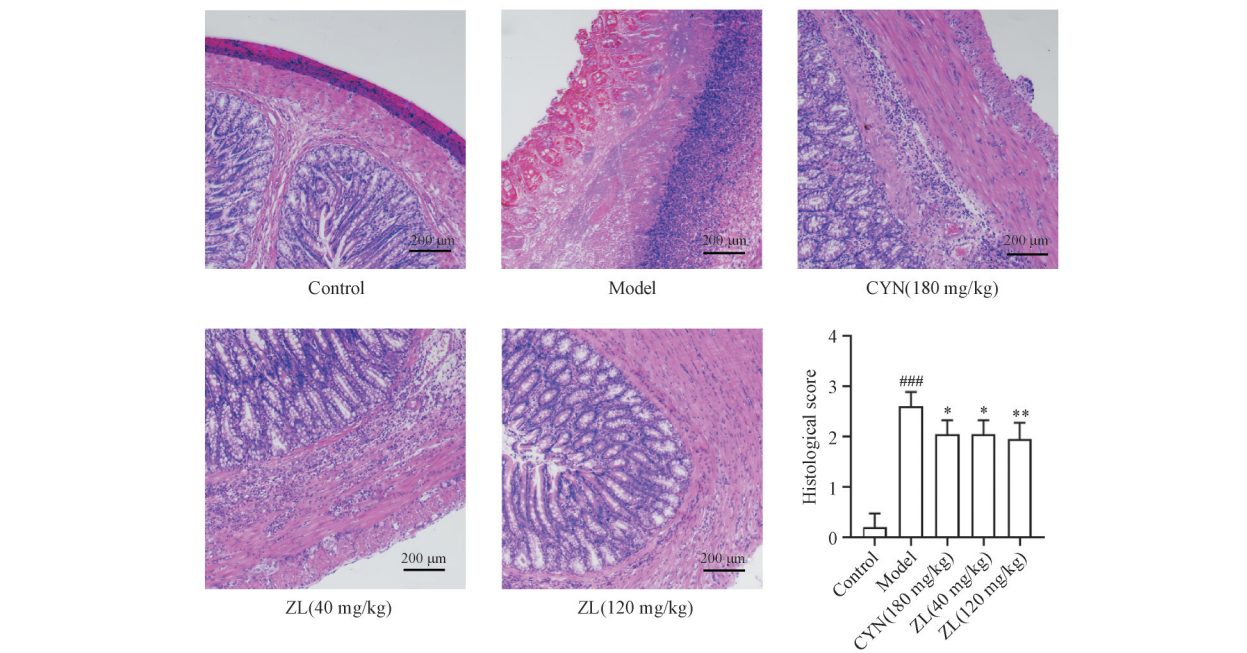
**Figure 2** Effects of Zhuling Jianpi capsule on the morphologic changes of colon in colitis rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

A: Colon image; B: Colon length; C:Relative colon index

### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

结肠HE染色结果如图3所示,与对照组相比,模型组结肠组织杯状细胞丢失,隐窝结构被破坏,出现大量炎性细胞浸润,而术苓与肠炎宁给药后

病理情况有所改善。对结肠HE切片进行评分发现,模型组评分显著高于对照组( $P < 0.05$ ),经药物治疗后,DAI评分显著下降( $P < 0.05$ )。



**Figure 3** Representative HE staining of colon tissue in colitis rats (200 ×) and histological score ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model group

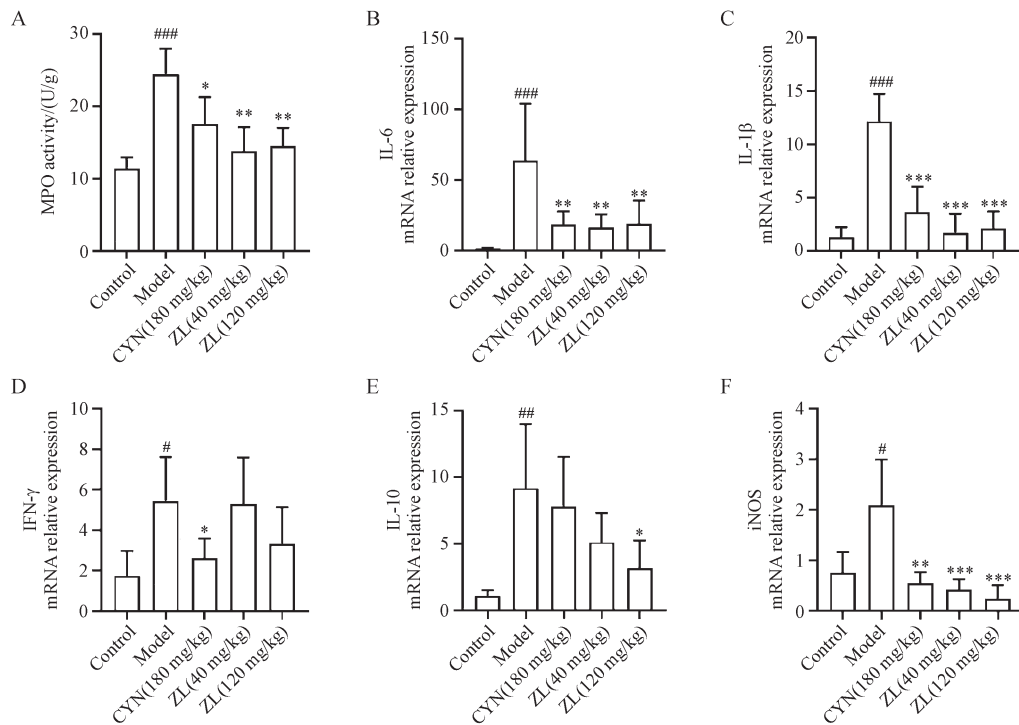
### 3.3 术苓对结肠炎大鼠结肠炎症因子表达的影响

MPO是来源于中性粒细胞的蛋白质,其酶活性反映中性粒细胞浸润能力。由图4-A所示,与对照组相比,模型组大鼠结肠组织MPO酶活性显著升高( $P < 0.05$ ),而术苓与肠炎宁治疗后能显著抑制MPO酶活的升高( $P < 0.05$ ,图4-A)。RT-qPCR检测结肠中IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、iNOS、IL-10的

mRNA表达,结果发现,与对照组相比,模型组大鼠结肠中上述炎症因子的mRNA表达水平均显著增加( $P < 0.05$ ),而给药治疗后均显著下降( $P < 0.05$ ),且呈现剂量依赖性(图4-B ~ 4-F)。

### 3.4 术苓对结肠炎大鼠肠道紧密连接蛋白的影响

Occludin、ZO-1均为结肠上皮屏障的紧密连接蛋白。与对照组相比,模型组的occludin、ZO-1的

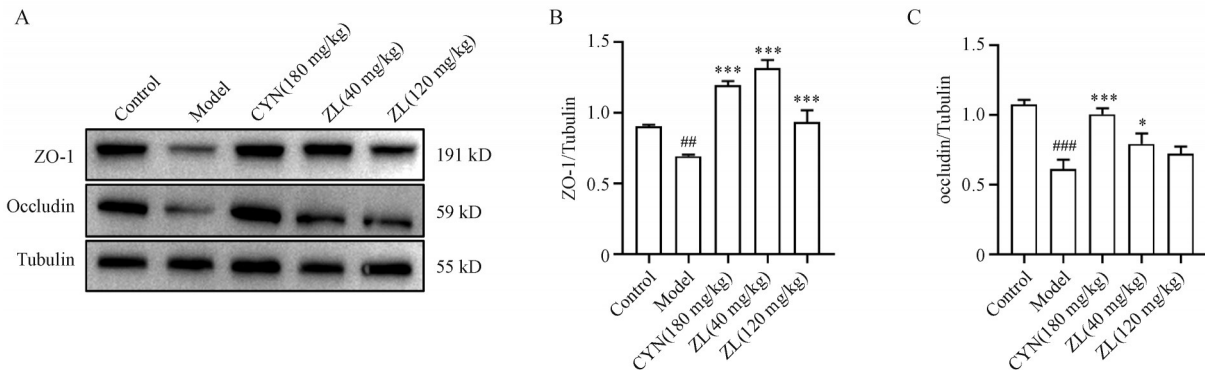


**Figure 4** Effect of Zhuling Jianpi capsule on inflammatory cytokines in the colon of colitis rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

A: Colonic MPO enzyme activity; B-F: Gene expression of IL-1β, IL-6, IFN-γ, IL-10 and iNOS in colonic tissue examined by quantitative RT-qPCR

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

蛋白表达显著下降( $P < 0.05$ ,图5-A-C),而给予术 平均显著上调。  
苓与肠炎宁治疗后,occludin、ZO-1的蛋白表达水



**Figure 5** Effects of Zhuling Jianpi capsule on intestinal tight junction protein expression of colitis rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

A: Western blot of the expression of colonic occludin and ZO-1 protein; B: Quantification of the expression of ZO-1; C: Quantification of the expression of occludin

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

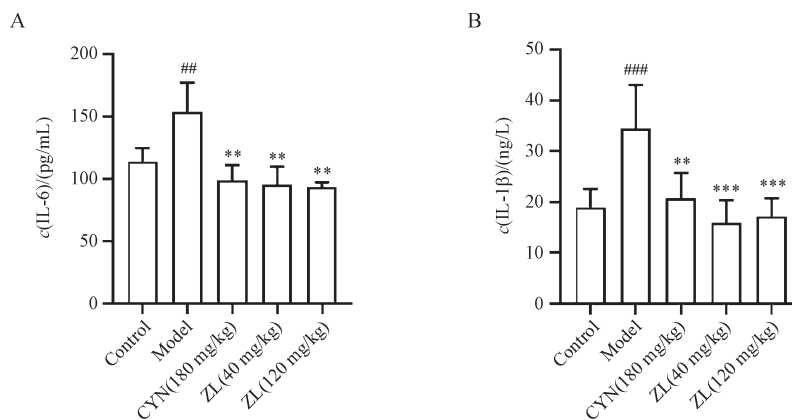
### 3.5 术苓对结肠炎大鼠血清炎症因子水平的影响

血清中炎症因子的含量是反映机体炎症状态的重要指标。通过ELISA检测发现,与对照组相比,模型组血清中IL-6、IL-1β水平显著增加( $P < 0.05$ ),而经术苓与肠炎宁治疗后,二者浓度均显

著下降( $P < 0.05$ ,图6)。

## 4 讨论

术苓由十八味中药组成。该复方中包含了多种抗炎药物。其中骨碎补在体内代谢的化学成分



**Figure 6** Effects of Zhuling Jianpi capsule on serum inflammatory factors IL-6 (A) and IL-1β (B) in colitis rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

<sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group

主要有黄酮类、三萜类、苯丙素类和木脂素类,具有保肾、消炎、降低血脂等作用<sup>[14]</sup>;而黄柏主要由盐酸小檗碱和盐酸巴马汀等生物活性成分组成,可以通过改善肠道菌群 $\alpha$ 多样性治疗小鼠腹泻<sup>[15]</sup>。白芍具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖等作用,可以通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)和核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)通路抑制细胞凋亡来减少炎症反应<sup>[16]</sup>。白术中含有多种生物活性化合物,例如小分子类(倍半萜类、三萜类、类固醇和香豆素)、生物活性多糖和糖蛋白等<sup>[17]</sup>。据研究报道,白术多糖可以通过恢复隐窝结构和减少炎症细胞浸润来保护肠屏障功能,并调节肠道菌群丰度<sup>[18-19]</sup>。白术内酯作为一种具有抗氧化和抗炎特性的倍半萜,主要通过阻断Toll样受体4(TLR4)-NF- $\kappa$ B和核因子E2相关因子2(Nrf2)通路来减少促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 和IL-6)的产生<sup>[20]</sup>。

本实验使用TNBS构建大鼠结肠炎实验模型,结果表明,模型组大鼠表现出严重的体重下降、腹泻伴随便血、死亡率增加等现象,而术苓给药治疗后大鼠以上症状得到缓解,初步证明了术苓对于TNBS诱导的大鼠结肠炎的治疗作用。结肠长度缩短以及黏膜充血性水肿是IBD的重要特征<sup>[21]</sup>,术苓给药可以显著抑制结肠的缩短,并缓解了结肠水肿。杯状细胞是散布在肠上皮柱状细胞中的分泌细胞,可通过分泌黏蛋白形成黏液层,是肠道屏障的重要组成部分<sup>[22]</sup>。隐窝主要是黏膜与黏膜下层向肠腔内突起的半环形皱襞,可增加结肠的

表面积,促进肠道吸收<sup>[23]</sup>。在本实验中,通过病理学检查发现,模型组大鼠表现为肠上皮细胞受损,杯状细胞破坏,隐窝结构丢失与炎症细胞浸润增加,而术苓给药后可以缓解上述病理损伤,部分恢复受损的肠道屏障功能。

MPO主要存在于中性粒细胞中。结肠组织中MPO的水平间接反映了肠组织中中性粒细胞浸润的程度<sup>[24]</sup>。IL-6、IL-1 $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 是重要的促炎性细胞因子,在结肠炎中大量分泌<sup>[25]</sup>。另外,有研究表明,在TNBS诱导的结肠炎大鼠的结肠与脾脏中iNOS活性显著增加,iNOS可诱导炎症因子过度浸润,引发氧化应激而导致组织进一步损伤<sup>[26]</sup>。在本实验中,术苓给药后显著降低了大鼠结肠MPO酶活力、结肠炎症因子的转录水平,以及血清中IL-6、IL-1 $\beta$ 含量,表明术苓给药后能显著降低大鼠结肠部位以及机体中的炎症状况。值得注意的是,IL-10作为抗炎因子,术苓治疗后,其转录水平也发生了上调,这可能是由于术苓给药促进了机体的抗炎修复系统有关。以occludin、ZO-1等为代表的紧密连接蛋白主要负责上皮细胞<sup>[27]</sup>构成屏障功能的形成。术苓给药可提高occludin、ZO-1的表达水平,显示其可以促进结肠上皮细胞屏障的恢复。

综上所述,术苓能显著改善TNBS构建的结肠炎大鼠的肠道炎症水平及肠上皮屏障功能。但是术苓的化学成分繁多,且化合物之间的协同作用对药效影响甚大,需要进一步探究其药效物质基础,阐明可能发挥作用的活性成分以进一步指导临床用药。



## References

- [1] Flynn S, Eisenstein S. Inflammatory bowel disease presentation and diagnosis [J]. *Surg Clin North Am*, 2019, **99** (6): 1051-1062.
- [2] Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: mechanisms and management [J]. *Gastroenterology*, 2022, **162** (3): 715-730.e3.
- [3] Balestrieri P, Ribolsi M, Guarino MPL, et al. Nutritional aspects in inflammatory bowel diseases [J]. *Nutrients*, 2020, **12** (2): 372.
- [4] Naftali T. An overview of cannabis based treatment in Crohn's disease [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, **14** (4): 253-257.
- [5] Yuan S, Li Y, Li J, et al. Traditional Chinese medicine and natural products: potential approaches for inflammatory bowel disease [J]. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 892790.
- [6] Sałaga M, Zatorski H, Sobczak M, et al. Chinese herbal medicines in the treatment of IBD and colorectal cancer: a review [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2014, **15** (3): 405-420.
- [7] Yang L, Luo H, Tan DC, et al. A recent update on the use of Chinese medicine in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Phytomedicine*, 2021, **92**: 153709.
- [8] Li ZH, Wang J, Cai RL, et al. Effects of Shenling Baizhu Powder on the expressions of AQP3 and AQP4 in UC rats via ERK/p38 MAPK signal pathway [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2015, **37** (9): 1883-1888.
- [9] Li MY, Luo HJ, Wu X, et al. Anti-inflammatory effects of Huangqin Decoction on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice through regulation of the gut microbiota and suppression of the ras-PI3K-Akt-HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2019, **10**: 1552.
- [10] Liu Y, Li BG, Su YH, et al. Potential activity of Traditional Chinese Medicine against Ulcerative colitis: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, **289**: 115084.
- [11] Alex P, Zachos NC, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, **15** (3): 341-352.
- [12] Zhang TT, Mei YL, Dong WF, et al. Evaluation of protein arginine deiminase-4 inhibitor in TNBS-induced colitis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, **84**: 106583.
- [13] Sałaga M, Mokrowiecka A, Zakrzewski PK, et al. Experimental colitis in mice is attenuated by changes in the levels of endocannabinoid metabolites induced by selective inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) [J]. *J Crohns Colitis*, 2014, **8** (9): 998-1009.
- [14] Chen SQ, Liang W, Zhang XM, et al. Research progress on chemical compositions and pharmacological action of *Drynariae Rhizoma* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, **46** (11): 2737-2745.
- [15] Xu BY, Yan YQ, Huang JC, et al. Cortex Phellodendri extract's anti-diarrhea effect in mice related to its modification of gut microbiota [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, **123**: 109720.
- [16] Lin HH, Zhang WY, Jiang XP, et al. Total glucosides of paeony ameliorates TNBS-induced colitis by modulating differentiation of Th17/Treg cells and the secretion of cytokines [J]. *Mol Med Rep*, 2017, **16** (6): 8265-8276.
- [17] Zhu B, Zhang QL, Hua JW, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Atractylodes macrocephala* Koidz.: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, **226**: 143-167.
- [18] Feng WW, Liu J, Tan YZ, et al. Polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* Koidz. Ameliorate ulcerative colitis via extensive modification of gut microbiota and host metabolism [J]. *Food Res Int*, 2020, **138** (Pt B): 109777.
- [19] Wang RJ, Zhou GS, Wang MY, et al. The metabolism of polysaccharide from *Atractylodes macrocephala* koidz and its effect on intestinal microflora [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, **2014**: 926381.
- [20] Bailly C. Atractylenolides, essential components of *Atractylodes*-based traditional herbal medicines: antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, **891**: 173735.
- [21] Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, et al. A comprehensive review and update on Crohn's disease [J]. *Dis Mon*, 2018, **64** (2): 20-57.
- [22] Hu JY, Huang H, Che Y, et al. Qingchang Huashi Formula attenuates DSS-induced colitis in mice by restoring gut microbiota-metabolism homeostasis and goblet cell function [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, **266**: 113394.
- [23] Pédrón T, Nigro G, Sansonetti PJ. From homeostasis to pathology: decrypting microbe-host symbiotic signals in the intestinal crypt [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, **371** (1707): 20150500.
- [24] Davies MJ, Hawkins CL. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, **32** (13): 957-981.
- [25] Leppkes M, Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel diseases - Update 2020 [J]. *Pharmacol Res*, 2020, **158**: 104835.
- [26] Kankuri E, Asmawi MZ, Korpela R, et al. Induction of iNOS in a rat model of acute colitis [J]. *Inflammation*, 1999, **23** (2): 141-152.
- [27] He CM, Deng J, Hu X, et al. Vitamin A inhibits the action of LPS on the intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins [J]. *Food Funct*, 2019, **10** (2): 1235-1242.