

健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清对脂多糖诱导人结肠上皮细胞炎症损伤模型的影响*

何玉华 瞿波 陈文 何金室 朱家恒 李明权

(成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072)

【摘要】 目的 通过观察健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清对人结肠上皮细胞炎症模型的干预效果, 探讨该方灌肠对肠道机械屏障的影响。方法 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白组、低剂量中药灌肠组、中剂量中药灌肠组、高剂量中药灌肠组, 每组 10 只。空白组不予灌肠, 低、中、高剂量组按 1:2:4 分别予 0.4、0.8、1.6 mL 中药灌肠, 每次保留 30 min, 每天早晚 2 次, 疗程 5 d, 于末次灌肠 1 h 后腹主动脉取血, 离心后收集上层血清。人正常结肠上皮细胞 (NCM460) 分为空白组、模型组、低剂量中药灌肠血清组、中剂量中药灌肠血清组、高剂量中药灌肠血清组; 除空白组外, 其余各组均加入脂多糖 (LPS) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导细胞炎症损伤, 中药灌肠血清组将细胞培养液更换为 10% 含药血清, 模型组加入空白组大鼠血清, 各组孵育 24 h 后检测细胞上清 Claudin-1、Occludin、ZO-1、OD 值、IL-6、TNF- α 。结果 与空白血清干预相比, 中药灌肠含药血清可增加炎症损伤细胞的 OD 值, 但不同剂量之间的作用效果未见差异 ($P > 0.05$); 与空白血清干预相比, 中药灌肠含药血清可降低炎症损伤细胞的上清 IL-6 及 TNF- α 水平, 且高剂量的作用效果更为显著 ($P < 0.05$); 与空白血清干预相比, 中药灌肠的含药血清可增加炎症损伤细胞的 Claudin-1、Occludin 及 ZO-1 相对表达量, 且高剂量的作用效果更为显著 ($P < 0.05$)。结论 健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清可以增强肠上皮细胞活性, 增加肠上皮细胞间紧密连接相关蛋白的表达, 可能有助于保护肠道机械屏障功能, 从而减轻局部炎症状态。

【关键词】 慢性肾脏病; 中药灌肠; 肠-肾轴; 肠道机械屏障; 炎症状态

【中图分类号】 R285.5; R-332 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.12.006

Effect of drug-containing serum of Jianpi Yishen Xiezhuo decoction on LPS-induced inflammatory injury of human colonic epithelial cells

HE Yuhua, QU Bo, CHEN Wen, HE Jinshi, ZHU Jiaheng, LI Mingquan

(Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the intervention effect of drug-containing serum of Jianpi Yishen Xiezhuo decoction on human colonic epithelial cell inflammation model, and explore the effect of Jianpi Yishen Xiezhuo decoction on intestinal mechanical barrier. **Methods** 40 SPF SD rats were randomly divided into blank group ($n=10$), low dose TCM herb enema group ($n=10$), middle dose traditional Chinese medicine enema group ($n=10$) and high dose traditional Chinese medicine enema group ($n=10$). The blank group was not given enema, and the low, middle and high dose groups were given 0.4 mL, 0.8 mL and 1.6 mL traditional Chinese medicine enema at 1:2:4 for 30 minutes each time, twice in the morning and evening every day for 5 days. One hour after the last enema, blood was taken from the abdominal aorta, and the upper serum was collected after centrifugation. Human normal colonic epithelial cells (NCM460) were divided into blank group, model group, low-dose TCM herb enema serum group, medium-dose TCM herb enema serum group and high-dose TCM herb enema serum group. Except for the blank group, the other groups were added with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to induce cell inflammatory injury. The TCM herb enema serum group replaced the cell culture medium with 10%

基金项目: 全国中医药创新骨干人才培养项目, 国家中医药管理局, 国中医药人教函([2019]128); 基于 DRGs 的慢性肾功能衰竭(非透析)中西医结合诊疗临床方案路径优化方案研究, 四川省中医药管理局(2020LC0077); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划(XSGG2019014)

通信作者: 李明权, 博士, 主任医师, E-mail: lmq863@126.com

引用本文: 何玉华, 瞿波, 陈文, 等. 健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清对脂多糖诱导人结肠上皮细胞炎症损伤模型的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(12): 1747-1752. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.12.006

drug-containing serum, and the model group was added with the rat serum of the blank group. After incubation for 24 hours, the supernatant of cells were detected for Claudin-1, Occludin, ZO-1, OD, IL-6, TNF- α . **Results** Compared with blank serum intervention, TCM herb enema drug-containing serum could enhance the OD value of inflammatory injured cells, but there was no difference among different doses, compared with blank serum intervention, TCM herb enema drug-containing serum could reduce the levels of IL-6 and TNF- α in the supernatant of inflammatory injured cells, and the effect of high dose was more significant. Compared with the blank serum intervention, the drug-containing serum of TCM herb enema can increase the relative expression of Claudin-1, Occludin and ZO-1 of inflammatory injury cells, and the effect of high dose is more significant. **Conclusion** The drug-containing serum of Jianpi Yishen Xiezhuo decoction can enhance the activity of intestinal epithelial cells and increase the expression of tight junction-related proteins between intestinal epithelial cells, which may help to protect the intestinal mechanical barrier function and reduce local inflammation.

【Key words】 CKD; TCM herb enema; Gut-Kidney axis; Intestinal mechanical barrier; Inflammatory state

慢性肾脏病(Chronic Kidney Disease,CKD)是一种并发症多,破坏性强,不可逆转的疾病。近年来,诸多证据表明 CKD 患者的肠道微生物组与宿主的病理生理状态相关^[1-2],有学者据此提出了“肠-肾轴(Gut-Kidney Axis)”理论^[3]。该理论的核心观点认为肠道与 CKD 之间存在双向作用,一方面肾脏功能受损导致肠道菌群失调、肠道屏障功能破坏;另一方面肠道菌群及其代谢毒素通过受损的肠黏膜屏障入血,激活单核巨噬细胞系统,释放大量细胞因子、炎症因子、氧自由基等细胞毒性物质,诱发慢性炎症,从而加速肾脏损伤。由此可知,肠道屏障功能受损是“肠-肾轴”致病过程中的关键环节。我国自 20 世纪 60 年代开始就把结肠作为中药治疗 CKD 的靶点,利用大肠传导糟粕以降浊的功能特点,祛邪外达,调整阴阳,延缓疾病进展。本研究旨在通过观察大鼠灌肠含药血清对脂多糖诱导人结肠上皮细胞炎症模型的干预效果,探讨中药灌肠对肠道机械屏障的影响,为中药灌肠治疗 CKD 提供更多理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂 人正常结肠上皮细胞(NCM460, CL0172, 丰晖生物), SPF 级 SD 大鼠,体质量(200±26)g。96 孔细胞培养板(07-6096, 山东 Biologix), 6 孔细胞培养板(07-6006, 山东 Biologix), 离心管(LPLXG, 15 mL, 杭州 LABSELECT), 高糖培养基(DMEM, PM150210, 武汉普诺赛), 胎牛血清(FBS, 10100, 500 mL, 北京 Gibco), 双抗(SV30010, 100 mL, 美国 HyClone), 胰酶(+EDTA, S310JV, 100 mL, 上海源培生物), CCK-8(BS350B, 5 * 100T, 安徽 Bio-sharp), 二甲基亚砜(DMSO, D5879, 100 mL, 美国 Sigma-Aldrich), PBS 缓冲液干粉(201201A17, 1L, 上海远慕生物), Rat IL-6 ELISA KIT(ZC-36404, 48Test, 上海茁彩生物), Rat TNF- α ELISA KIT(ZC-37624, 48 Test, 上海茁彩生物), Western、IP 细胞裂解液(P0013, 上海 Beyotime), BCA 蛋白浓度测定试

剂盒(P0009, 上海 Beyotime), PAGE 凝胶快速制备试剂盒(PG112, 上海雅酶生物), 预染蛋白 Marker(180kDa, RM19001, 武汉 ABClonal), 预染蛋白 Marker(250kDa, 26619, 美国 Thermo Fisher Scientific), ECL 发光试剂盒(KF001, 江苏 Affinity Biosciences), Immobilon-PSQ PVDF 膜(ISEQ00010, 美国 Sigma-Aldrich), Glycine(1275GR500, 广州 Biofroxx), Tris for molecular biology(1115GR500, 广州 Biofroxx), 十二烷基磺酸钠(SDS, 1177GR500, 广州 Biofroxx), 过硫酸铵溶液(天津市致远化学试剂有限公司), 盐酸异丙醇溶液(天津市致远化学试剂有限公司), ZO-1 抗体(兔克隆抗体, AF5145, 江苏 Affinity Biosciences), Claudin1 抗体(兔克隆抗体, AF0127, 江苏 Affinity Biosciences), Occludin 抗体(兔克隆抗体, 91131, 美国 Cell Signaling Technology), β -actin 抗体(兔克隆抗体, AC026, 武汉 ABClonal), 生物素化山羊抗兔 IgG(H+L, ab6721, 英国 Abcam)。

1.2 实验设备 倒置生物显微镜(DMI1, 德国 LEICA), 台式低速离心机(TDZ4-WS, 长沙湘仪集团), 高速低温离心机(H2050R, 长沙湘仪集团), 二氧化碳培养箱(MCO-15AC, 日本 SANYO), 压力蒸汽灭菌器(SYQ-DSX-280B, 上海宜川仪表厂), 水浴锅(HH-1, 金坛市荣华仪器制造有限公司), 优谱超纯水制造系统(UPH-II-10T, 成都超纯科技有限公司), 酶标仪(SpectraMAX Plus 384, 美国 Molecular Devices), 移液枪(2、10、20、200、1000 μ L, 北京大龙兴创实验仪器有限公司), 枪头(20、200、1000 μ L, 美国 Axygen), EP 管(1.5 mL、0.2 mL、100 μ L, 美国 Axygen), 垂直电泳槽(JY-SCZ4+, 北京君意东方电泳设备有限公司), 电泳仪(JY200C, 北京君意东方电泳设备有限公司), 水平脱色摇床(TY-80A, 江苏科析仪器有限公司), 化学发光凝胶成像仪(5200, 上海天能科技有限公司), 多功能酶标仪(MK3, 美国 Thermo Fisher Scientific), 超低温冰箱(DW-86L386, 海尔集团)。

1.3 方法

1.3.1 中药灌肠液制备 课题组前期通过数据挖掘结果创立健脾益肾泄浊汤,含黄芪、大黄、煅牡蛎、蒲公英、丹参、附子。上述药物均采购于成都中医药大学附属医院中药房,中药灌肠液由成都中医药大学附属医院药剂部自动煎药机煎煮。

1.3.2 含药血清提取 40 只 SPF 级 SD 大鼠,随机分为空白组、低剂量中药灌肠组、中剂量中药灌肠组、高剂量中药灌肠组,每组 10 只。根据公式测算^[4]并结合前期预实验结果,空白组不予灌肠,低、中、高剂量组按 1:2:4 分别予 0.4、0.8、1.6 mL 中药灌肠。大鼠固定于鼠板,头朝斜下,尾朝斜上,露出肛门。药液与大鼠肛门温度相近(37.5~39℃)。将直头灌肠软管缓慢轻柔插入大鼠肛门,固定软管,缓慢注射药物,灌肠后予固定体位 30 min。大鼠每天灌肠 2 次,连续灌肠 5 d。于末次灌肠 1 h 后腹主动脉取血,3000 r/min 离心 15 min,分离血清,收集上层血清,微孔滤膜过滤后置 -80℃ 保存备用。

1.3.3 细胞培养 细胞复苏:将 NCM460 细胞冻存管放入 37℃ 水浴锅中,轻轻晃动管身,待冻存液融化后转入超净台,转移入 15 mL 离心管,按冻存液 3 倍体积加入新鲜培养基,250 g 离心 5 min,吸弃上清,加入新鲜培养基,放置孵箱培养。细胞传代:吸弃旧培养基,用 PBS 洗涤 2 次,吸弃液体,加入孵温的胰酶,轻晃培养瓶以使消化液完全浸润细胞。倒置显微镜下观察细胞,若胞质回缩,细胞之间不再连接成片,则加入胰酶体积 3 倍的新鲜培养基终止消化。将消化后的细胞转移入 15 mL 离心管,250 g 离心 5 min,吸弃上清,加入新鲜培养基,以 1:3 传代培养。

1.3.4 细胞模型建立及分组 细胞分为空白组(Blank Group, BG)、模型组(Model Group, MG)、低剂量中药灌肠血清组(Low-dose Enema Group, LDEG)、中剂量中药灌肠血清组(Medium-dose Enema Group, MDEG)、高剂量中药灌肠血清组(High-dose Enema Group, HDEG)。除空白组外,其余各组均加入脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) 100 μg/mL 诱导细胞炎症损伤。中药灌肠血清组于加入 LPS 前 2 h,将细胞培养液更换为 10% 含药血清,模型组加入空白组大鼠血清,各组均孵育 24 h 后检测相应指标。

1.3.5 CCK-8 检测细胞活性、抑制率 取对数生长期的 NCM460 细胞,经 PBS 洗涤,胰蛋白酶消化后收集,250 g 离心 5 min,吸弃上清液,加入适量培养基使其成为单细胞悬液。调节细胞密度 5×10^4 /mL, 100 μL/孔接种于 96 孔板中(边缘孔用无菌 PBS 填充),37℃、5% CO₂ 恒温培养。待细胞贴壁后,设置空

白组(BG)、模型组(MG)、低剂量中药灌肠血清组(LDEG)、中剂量中药灌肠血清组(MDEG)、高剂量中药灌肠血清组(HDEG),每组重复 4 个样本。待药物作用 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃、5% CO₂ 恒温继续培养 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度(OD 值)。抑制率 = (1 - 实验组 OD/空白组 OD) × 100%。

1.3.6 ELISA 检测细胞上清 IL-6、TNF-α 水平 将所有试剂平衡至室温。空白对照孔不加样品,只加显色剂 A、B 和终止液;标准品孔,加入配好的标准品 50 μL,然后加入辣根过氧化物酶 100 μL。待测样品孔,加入样本 50 μL,然后辣根过氧化物酶 100 μL,盖上封板膜,37℃ 温育 60 min。每孔加满洗涤液,静置 1 min 后吸弃,如此重复 5 次,拍干。显色:每孔先加入底物液 A 50 μL,再加入底物液 B 50 μL,轻轻震荡混匀,37℃ 避光显色 15 min。终止:每孔加终止液 50 μL,终止反应。在 15 min 内,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。

1.3.7 Western Blot 检测 Claudin-1、Occludin、ZO-1 蛋白水平 取 NCM460 细胞样本,加入 RIPA 裂解液(细胞:裂解液 = 1:10),裂解 10 min 后收集裂解液,4℃、12000 rpm 离心 10 min。后取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。各实验组取 50 μL,按 4:1 比例加入 5 × Loding buffer,混匀后热循环仪 95℃,15 min,-80℃ 保存。待积层胶凝固后拔出,置入电泳槽中电泳。将 PVDF 膜与分离胶同时放入转膜液中平衡 10 min。将凝胶面与负极相连,PVDF 膜与正极相连,接通电源,200 mA 转膜 1~2 h。将 PVDF 膜放入一抗(一抗浓度 ZO-1 1:1000;Claudin-1 1:1000;Occludin 1:1000;β-actin 1:100000),4℃ 孵育过夜。用 TBST 冲洗 3 次,后将 PVDF 膜放入二抗(稀释浓度:1:5000),室温孵育 2~3 h,再次用 TBST 冲洗 3 次。滴加 ECL 发光液显色曝光,用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 对条带进行曝光扫描,结果以目的蛋白相对表达量表示。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白积分光密度值(IOD)/内参积分光密度值(IOD)。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析,多样本均数间比较采用 One-Way ANOVA 检验,方差齐则采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计意义。

2 结果

2.1 各组细胞活性、抑制率比较 经 LPS 造模后,细胞活性降低;与空白血清干预相比,中药灌肠的含药血清可增强炎症损伤细胞的活性,但不同剂量之间的

作用效果未见差异;LPS 造模后,细胞抑制率增加;与空白血清干预相比,高剂量中药灌肠的含药血清可降低炎症损伤细胞的抑制率,低剂量与中剂量均未发现该效应。见表 1。

表 1 不同分组细胞 OD、抑制率($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Determination of OD value of cells in different groups

组别	细胞 OD 值	抑制率($\times 10^{-2}$)
BG	1.0535 \pm 0.0393	0.00 \pm 0.00
MG	0.8408 \pm 0.0364 ^①	20.0705 \pm 5.3624
LDEG	0.9295 \pm 0.0541 ^②	11.5748 \pm 7.9321
MDEG	0.9519 \pm 0.0832 ^②	9.3282 \pm 11.6061
HDEG	0.9719 \pm 0.0430 ^②	7.7033 \pm 3.7457 ^②

注:与 BG 相比,① $P < 0.05$;与 MG 相比,② $P < 0.05$

2.2 各组细胞上清 IL-6、TNF- α 比较 经 LPS 造模后,细胞上清 IL-6 水平升高;与空白血清干预相比,中药灌肠的含药血清可降低炎症损伤细胞的上清 IL-6 水平,且高剂量的作用效果较低剂量与中剂量更为显著。经 LPS 造模后,细胞上清 TNF- α 水平升高;与空白血清干预相比,中药灌肠的含药血清可降低炎症损伤细胞的上清 TNF- α 水平,且高剂量的作用效果较低剂量更为显著。见表 2。

表 2 不同分组细胞 IL-6、TNF- α 比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Table 2 Determination of IL-6 in cells of different groups

分组	IL-6	TNF- α
BG	24.0433 \pm 0.8922	30.1573 \pm 1.4379
MG	33.4563 \pm 0.2245 ^①	39.547 \pm 1.1657 ^①
LDEG	32.1363 \pm 0.8556 ^②	37.7507 \pm 1.1955 ^②
MDEG	30.6767 \pm 0.6415 ^②	35.132 \pm 1.973 ^②
HDEG	28.833 \pm 0.848 ^{②③④}	33.2357 \pm 1.2839 ^{②③}

注:与 BG 相比,① $P < 0.01$;与 MG 相比,② $P < 0.05$;与 LDEG 相比,③ $P < 0.05$;与 MDEG 相比,④ $P < 0.05$

2.3 各组细胞 Claudin-1、Occludin、ZO-1 相对表达量比较 经 LPS 造模后,细胞 Claudin-1 相对表达量下降;与空白血清干预相比,中药灌肠的含药血清可增加炎症损伤细胞的 Claudin-1 相对表达量,且作用强度与剂量成正比。与 BG 相比,MG 的 Occludin 相对表达量降低;与 MG 相比,LDEG、MDEG、HDEG 的 Occludin 相对表达量升遍;LDEG 与 HDEG 间的 Occludin 相对表达量比较差异有统计意义;LDEG 与 MDEG、MDEG 与 HDEG 之间的 Occludin 相对表达量比较差异无统计意义。结果表明,经 LPS 造模后,细胞 Occludin 相对表达量下降;与空白血清干预相比,中药灌肠的含药血清可增加炎症损伤细胞的 Occludin 相对表达量,且高剂量的作用效果较低剂量更为显著。经 LPS 造模后,细胞 ZO-1 相对表达量下降;与空白血清干预相比,中药灌肠的含药血清可增

加炎症损伤细胞的 ZO-1 相对表达量,且高剂量的作用效果较低剂量更为显著。见图 1~3,表 3。

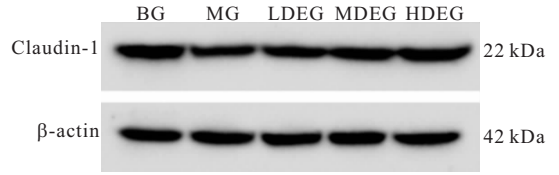


图 1 不同分组细胞 Claudin-1 表达电泳图

Figure 1 Electrophoresis of Claudin-1 expression in different groups of cells

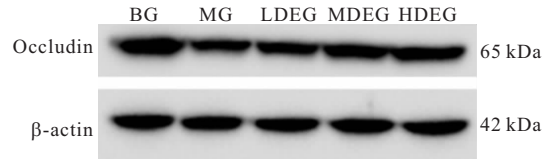


图 2 不同分组细胞 Occludin 表达电泳图

Figure 2 Electrophoresis of Occludin expression in different groups of cells

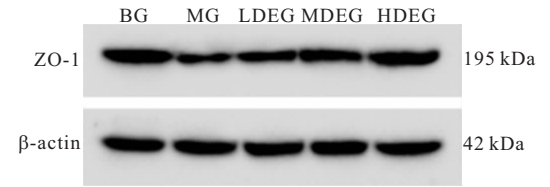


图 3 不同分组细胞 ZO-1 表达电泳图

Figure 3 Electrophoresis of ZO-1 expression in different groups of cells

表 3 不同分组细胞 Claudin-1、Occludin、ZO-1 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Relative expression of Claudin-1 in cells of different groups

组别	Claudin-1	Occludin	ZO-1
BG	1.0009 \pm 0.0510	1.0007 \pm 0.0444	0.9997 \pm 0.0244
MG	0.5729 \pm 0.0395 ^①	0.5836 \pm 0.0234 ^①	0.5520 \pm 0.0638 ^①
LDEG	0.6523 \pm 0.0144 ^②	0.6659 \pm 0.0096 ^②	0.6427 \pm 0.0479
MDEG	0.7392 \pm 0.0261 ^{②③}	0.7687 \pm 0.0311 ^②	0.7320 \pm 0.0298 ^②
HDEG	0.8476 \pm 0.0112 ^{②③④}	0.8850 \pm 0.0478 ^{②③}	0.8888 \pm 0.0709 ^{②④}

注:与 BG 相比,① $P < 0.05$;与 MG 相比,② $P < 0.05$;与 LDEG 相比,③ $P < 0.05$;与 MDEG 相比,④ $P < 0.05$

3 讨论

本实验基于“肠-肾轴”理论,以健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清为干预手段,观察人结肠上皮细胞肠道屏障相关蛋白及炎症指标的变化,探讨该方灌肠对肠道机械屏障以及局部炎症状态的影响。研究结果显示,健脾益肾泄浊汤方灌肠含药血清可增加炎症损伤后 NCM460 细胞的 OD 值,增加 Claudin-1、Occludin 及 ZO-1 相对表达量,降低 IL-6、TNF- α 水平,且高剂量的效果更为显著。

在肠道机械屏障功能正常的情况下,LPS 无法进入血液循环,而 CKD 患者肠道黏膜通透性增高,LPS 可借此移位进入血液循环,刺激炎症细胞因子释放,

导致全身性炎症状态。多项研究证实了 CKD 患者/动物模型存在肠道机械屏障功能受损^[5-7]。在体外试验中, LPS/内毒素亦可引起内皮细胞损伤^[8]。因此本实验通过对 NCM460 细胞进行 LPS 造模, 模拟 CKD 患者肠上皮细胞炎症状态。结果显示, 经 LPS 处理后, 细胞抑制率升高, 细胞活性下降, 提示细胞损伤。同时, LPS 能诱导细胞产生炎症因子, 导致细胞上清 IL-6、TNF- α 水平均不同程度升高, 与 CKD 患者的微炎症状态类似。

虽然中药灌肠已广泛应用于 CKD 的治疗当中, 但鲜有关于该法对肠道机械屏障功能影响的研究。肠道机械屏障, 由肠上皮细胞和顶端连接复合体组成有滤过和屏蔽的双向作用^[9]。其中, 紧密连接是顶端连接复合体最主要的连接方式^[10], 主要由三个部分组成: 粘附性跨膜蛋白, 包括紧密连接蛋白 (Claudin) 和闭锁蛋白 (Occludin) 家族; 闭锁小带蛋白 (Zonula Occluden, ZO) 家族; 肌动蛋白和肌球蛋白连接环。多项试验表明, 从紧密连接处去除 Occludin, 会降低紧密连接的稳定性, 导致屏障功能受损^[11-12]。Claudin 多种异构体可以调节屏障功能^[13]。本研究中, NCM460 细胞经过 LPS 处理后, 其紧密连接相关结构破坏, 如 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 的表达量均下降, 提示肠上皮细胞屏障功能受损。其他动物实验也发现, CKD 大鼠空肠和回肠上皮紧密连接的关键蛋白成分 (Claudin-1、Occludin) 显著减少^[14]。本实验采用的健脾益肾泄浊汤来自于前期数据挖掘结果, 含黄芪 (30g)、大黄 (30g)、煅牡蛎 (30g)、蒲公英 (20g)、丹参 (20g)、附子 (10g)。实验结果显示, 该方灌肠含药血清较空白血清能显著提高肠上皮细胞活性, 减少 IL-6、TNF- α 含量, 增加 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 的表达。表明健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清可以增强肠上皮细胞活性、增加肠上皮细胞间紧密连接相关蛋白的表达, 可能有助于保护肠道机械屏障功能, 从而减轻局部炎症状态。有研究者利用单药大黄灌肠, 同样发现中药灌肠能改善大鼠肠道机械屏障功能, 调节肠道菌群失调, 抑制全身炎症反应, 减轻肾纤维化^[15]。钟丹等^[16]利用中药复方 (黄芪 20 g、大黄 30 g、牡蛎 30 g、蒲公英 30 g) 对 CKD 大鼠模型灌肠, 也发现通腑泄浊法能保护肠黏膜屏障功能。恢复肠道机械屏障功能可有效阻止肠腔内的诸多有害物质, 如微生物、微生物代谢毒素、炎症因子等进入全身血液循环, 理论上可减轻全身微炎症状态, 减少肠源性毒素的蓄积, 缓解尿毒症毒素引起的临床症状, 延缓 CKD 持续进展。一项针对 IgA 肾病的临床研究表明, 经过 4 年的随访, 肠道通透性增高患者的肾小球

滤过率, 其下降程度明显大于肠道通透性正常的患者^[17]。

当中药灌肠液进入肠腔后, 主要通过被动扩散吸收入血, 因此药液吸收量与药液的体积和浓度密切相关。本实验发现, 与模型组相比, 高剂量中药灌肠组在多项指标中均具有统计学差异, 并且在 IL-6、Claudin-1 中显示了药液剂量-效应关系。由此推导, 在中药灌肠的临床应用当中, 可提高药液浓度, 并在患者耐受程度内增加药液剂量, 以求最大疗效。本研究采用了中药复发制剂, 药物成分复杂, 现有条件难以确定目标血药浓度, 因此无法进行精确的血药浓度测算, 仅以剂量的倍数 1:2:4 确定低、中、高剂量分组, 所以并未在全部实验指标中观察到剂量-效应关系。另外, 中药煎煮工艺的干扰因素多, 不同批次药液的浓度参差不齐, 难以保证药物等效性, 也是造成这一实验现象的可能原因。

受限于时间及经费, 本研究仅使用了 Western blot 检测肠道紧密连接关键蛋白的表达, 未使用实时荧光定量 PCR 进一步验证。另外, 本研究仅为细胞实验, 虽然结果表明中药灌肠能够一定程度的修复肠道机械屏障功能, 但具体机制尚未可知。肠道通透性与肠道屏障功能相反, 由于肠道黏膜必须同时促进水分和营养物质的运输, 同时起到保护屏障的作用, 因此需要更多的研究去揭示这两种功能的转换机制。

目前, 针对肠道上皮屏障损伤的最佳疗法是治疗基础疾病, 而靶向修复上皮细胞具有治疗前景, 包括肠道干细胞植入^[18]以及增强上皮细胞扩增相关信号通路的表达^[19], 但上述方法可能导致上皮细胞恶性增殖^[20]。本研究发现健脾益肾泄浊汤灌肠的含药血清能修复人结肠上皮细胞间的紧密连接, 减轻局部炎症状态, 对肠道机械屏障功能有一定的保护作用, 理论上可延缓 CKD 进展。此外, 阐明参与紧密连接调控的信号通路将有助于发现新的屏障修复剂, 从而提供更加有效的 CKD 治疗方法。

4 结论

健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清可以增强肠上皮细胞活性, 增加肠上皮细胞间紧密连接相关蛋白的表达, 可能有助于保护肠道机械屏障功能, 从而减轻局部炎症状态。

【参考文献】

- [1] TROPINI C, EARLE K A, HUANG K C, SONNENBURG J L. The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function[J]. Cell Host Microbe, 2017, 21(4): 433-442.
- [2] KIM S M, SONG I H. The clinical impact of gut microbiota in chronic kidney disease[J]. Korean J Intern Med, 2020, 35(6):

1305-1316.

[3] MEIJERS B K, EVENEPOEL P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(3):759-761.

[4] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

[5] VAZIRI N D, YUAN J, NORRIS K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease[J]. *Am J Nephrol*, 2013, 37(1):1-6.

[6] FEROUZE U, KALANTAR-ZADEH K, STERLING K A, *et al.* Examining associations of circulating endotoxin with nutritional status, inflammation, and mortality in hemodialysis patients[J]. *J Ren Nutr*, 2012, 22(3):317-326.

[7] VAZIRI N D, GOSHTASBI N, YUAN J, *et al.* Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 36(5):438-443.

[8] CHAN W, BOSCH J A, PHILLIPS A C, *et al.* The Associations of Endotoxemia With Systemic Inflammation, Endothelial Activation, and Cardiovascular Outcome in Kidney Transplantation[J]. *J Ren Nutr*, 2018, 28(1):13-27.

[9] CAMILLERI M, MADSEN K, SPILLER R, *et al.* Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(6):503-512.

[10] SHIGETOMI K, IKENOUCI J. Regulation of the epithelial barrier by post-translational modifications of tight junction membrane proteins[J]. *J Biochem*, 2018, 163(4):265-272.

[11] MARCHIANDO A M, SHEN L, GRAHAM W V, *et al.* Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo[J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(1):111-126.

[12] VAN ITALLIE C M, FANNING A S, HOLMES J, *et al.* Oc-

cludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 16):2844-2852.

[13] FINDLEY M K, KOVAL M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins[J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(4):431-437.

[14] VAZIRI N D, YUAN J, NAZERTEHRANI S, *et al.* Chronic kidney disease causes disruption of gastric and small intestinal epithelial tight junction [J]. *Am J Nephrol*, 2013, 38(2):99-103.

[15] JI C, DENG Y, YANG A, *et al.* Rhubarb Enema Improved Colon Mucosal Barrier Injury in 5/6 Nephrectomy Rats May Associate With Gut Microbiota Modification[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:1092.

[16] 钟丹, 黄宇清, 萧建华, 等. 通腑泄浊法对 CKD 模型大鼠肾功能及肠道屏障功能的影响[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2018, 39(6):92-95.

[17] KOVÁCS T, KUN L, SCHMELCZER M, *et al.* Do intestinal hyperpermeability and the related food antigens play a role in the progression of IgA nephropathy? I. Study of intestinal permeability[J]. *Am J Nephrol*, 1996, 16(6):500-505.

[18] AVANSINO J R, CHEN D C, WOOLMAN J D, *et al.* Engraftment of mucosal stem cells into murine jejunum is dependent on optimal dose of cells[J]. *J Surg Res*, 2006, 132(1):74-79.

[19] KIECKHAEFER J, LUKOVAC S, YE D Z, *et al.* The RNA polymerase III subunit Polr3b is required for the maintenance of small intestinal crypts in mice[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2(6):783-795.

[20] ODENWALD M A, TURNER J R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1):9-21.

(收稿日期:2022-02-21;修回日期:2022-03-30;编辑:黎仕娟)

(上接第 1746 页)

[18] 邵松军, 张湘宁, 史梦婕. ESO 联合 DDP 对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制效应及其机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(5):548-553.

[19] 叶才果, 潘海燕, 何志巍. 海洋来源的口蛄虾生物碱的分离纯化和抗鼻咽癌作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(12):2965-2966.

[20] 尹田鹏, 罗智慧, 王敏. 黔产乌头的二萜生物碱类成分研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(22):3096-3100.

[21] 赵鹤鹏, 王洪彪, 程寅伟. 沙棘叶黄酮纯化及含量测定研究进展 [J]. *南方农业*, 2019, 13(30):129-131.

[22] 王槐高, 黄培春. 口蛄抗鼻咽癌细胞生长活性成分的初步分析

[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(11):1861-1864.

[23] FRITSCH M, GUNTHER S D, SCHWARZER R, *et al.* Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis[J]. *Nature*, 2019, 575(7784):683-687.

[24] MONIE T P, BRYANT C E. Caspase-8 functions as a key mediator of inflammation and pro-IL-1 β processing via both canonical and non-canonical pathways[J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1):181-93.

[25] 唐旭东, 赵南, 周克元. HHT 对鼻咽癌细胞 caspase-8 蛋白和 mRNA 表达的影响[J]. *基础医学与临床*, 2004, 24(5):528-531.

(收稿日期:2022-01-06;修回日期:2022-04-09;编辑:黎仕娟)