

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.007

四君子汤对溃疡性结肠炎小鼠模型 occludin 和 claudin-1 表达的影响 *

黄晓燕 郑超伟 罗莉川 赵一娜 王 萌 刘熙荣 李生发

(广西中医药大学第一附属医院脾胃科 广西 南宁 530023)

摘要 目的:探讨四君子汤对溃疡性结肠炎(UC)小鼠模型结肠粘膜中 occludin、claudin-1 表达的影响。**方法:**采用右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导 UC 小鼠模型,实验分为五组,即正常组、模型组、四君子汤低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组、西药组,共治疗 7 天。对小鼠肠黏膜的大体形态和组织病理变化进行观察,使用 RT-PCR 和 Western blot 检测 occludin、claudin-1 mRNA 和蛋白的表达。**结果:**与模型组相比较,四君子汤低、中、高剂量治疗组以及西药组小鼠的饮食、体重、精神、活动度、脓血便等一般情况有所改善,黏膜层缺损、隐窝破坏、炎症细胞浸润等病理表现有所缓解。与模型组相比较,高剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白和 mRNA 的表达升高($P < 0.05$),低剂量和中剂量治疗组也有不同程度的升高。与西药组相比较,低、中、高剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白和 mRNA 的表达无统计学差异($P > 0.05$)。**结论:**四君子汤可以改善脓血便等症状,缓解肠黏膜的损伤,上调 occludin 和 claudin-1 的表达,对 UC 小鼠有治疗作用。

关键词:四君子汤;溃疡性结肠炎;紧密连接蛋白;occludin;claudin-1

中图分类号:R-33;R574.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)05-829-05

Effect of Sijunzi Decoction on Occludin and Claudin-1 Expression in Ulcerative Colitis Mice Model*

HUANG Xiao-yan, ZHENG Chao-wei, LUO Li-chuan, ZHAO Yi-na, WANG Meng, LIU Xi-rong, LI Sheng-fa

(Department of Spleen and Stomach, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530023, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Sijunzi decoction on occludin and claudin-1 expression in ulcerative colitis(UC) mice model. **Methods:** The UC mice model was induced by dextran sulfate sodium (DSS). The experiment was divided into five groups: normal group, model group, low-dose treatment group, middle-dose treatment group, high-dose treatment group and western medicine group. The treatment lasted for 7 days. The morphological and histopathological changes of intestinal mucosa in mice were observed. The mRNA and protein expressions of occludin and claudin-1 were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** Compared with the model group, the diet, body weight, spirit, activity and bloody purulent stool of the mice in the low, middle and high dose Sijunzi decoction treatment group and Western medicine group were improved, and the pathological manifestations such as mucosal defect, crypt destruction and inflammatory cell infiltration were alleviated. Compared with the model group, the protein and mRNA expressions of occludin and claudin-1 in the high-dose treatment group increased ($P < 0.05$), and the protein and mRNA expressions of occludin and claudin-1 in the low-dose and middle-dose treatment groups also increased in varying degrees. Compared with the western medicine group, there was no significant difference in the protein and mRNA expressions of occludin and claudin-1 in the low, middle and high dose groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** Sijunzi Decoction can improve the symptoms of bloody purulent stool, relieve the damage of intestinal mucosa, up-regulate the expression of occludin and claudin-1, and has therapeutic effect on UC mice.

Keywords: Sijunzi decoction; Ulcerative colitis; Tight junction protein; occludin; claudin-1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R574.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-829-05

前言

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种以结肠黏膜慢性炎症伴上皮层溃疡为特征的难治性疾病,主要表现为腹泻、便血、黏液便、发热、贫血等^[1-3]。肠上皮屏障是肠黏膜屏障的首要防线,肠上皮屏障受损影响着 UC 的疾病进展^[4,5]。occludin、

claudin-1 是肠上皮屏障中两个重要的紧密连接蛋白,具有调节细胞间物质流动、维持上皮细胞极性、阻止毒性大分子和微生物通过等功能,在维护肠道屏障功能中发挥关键作用^[6,7]。中医学认为,UC 属于“肠癖”、“痢疾”等范畴,病位在大肠,与脾肾关系密切,其病机主要以脾虚为本,湿热毒瘀贯穿疾病之始终,伏邪发病是其主要特点^[8,9]。因此,我们抓住 UC 的病机之本,以固

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81460714);广西壮族自治区自然科学基金项目(2014GXNSFBA118183)

作者简介:黄晓燕(1979-),女,博士,副主任医师,研究方向:脾胃病的中西医结合防治,E-mail: 18275785900@126.com

(收稿日期:2018-10-06 接受日期:2018-10-30)

护脾气为治疗原则,应用四君子汤对右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)法诱导 UC 模型小鼠进行干预,取得预期的疗效。我们前期实验研究证实四君子汤可通过调控端粒酶活性,起延缓肠黏膜细胞凋亡的作用。为进一步探讨四君子汤对 UC 模型小鼠肠上皮屏障中的紧密连接蛋白的调节作用,本研究采用 DSS 诱导的 UC 小鼠模型,观察四君子汤对小鼠结肠粘膜 occludin、claudin-1 及 mRNA 的影响,探讨四君子汤防治 UC 的有效机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材

实验试剂:DSS 溶液,分子量 36000-50000,购自 Sigma 公司,生理盐水配制成 5%浓度。RIPA 组织解液购自 solarbio 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天公司,PageRuler Prestained Protein Ladder 购自 Thermo Fisher 公司,occludin、claudin-1、GAPDH 兔单克隆抗体购自 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔)购自 SANTA CRUZ 公司,ECL 化学发光底物购自 BOSTER 公司,PCR 引物购自中国 Sangon 公司,逆转录试剂盒购自 Thermo Fisher 公司,PVDF 膜购自 Millipore 公司。

1.2 主要仪器

全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司),冷冻高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),RT-6000 自动酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司),电泳、电转系统 Bio-rad(美国 BIO-RAD),数码凝胶图像分析系统(杭州朗基科学仪器有限公司),荧光定量仪(ABI 7300),PCR 仪(美国 BIO-RAD)。

1.3 实验动物

健康 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠 120 只,6-8 周龄,体质量(19.61 ± 2.34)g,由广西医科大学医学动物实验中心提供,许可证号:SYXK 桂 2014-003。

1.4 实验药物

四君子汤(党参 15 g、白术 10 g、茯苓 15 g、炙甘草 6 g),购自广西中医药大学第一附属医院,以上药物由专人进行质检,确保中药饮片质量合格规范。用蒸馏水煎浓缩配制成 1 g 原生药/1 mL 的药液,过滤除菌分装 4℃ 保存备用。艾迪莎(美沙拉嗪缓释颗粒剂),购自天津博福-益普生有限公司,生产批号:H20100063。

1.5 方法

1.5.1 造模与分组 采用 5%DSS 灌肠法制作 UC 小鼠模型,

将 120 只 Balb/c 小鼠随机留取 20 只作为正常组,其余小鼠给予 5%DSS 自由饮用 3 周,造模成功后,随机分为 5 组,即模型组、低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组、西药组,每组 20 只。

1.5.2 给药 低、中、高剂量治疗组予以四君子汤灌胃,给药剂量根据小鼠与人的体表面积等效剂量比值进行折算,其中低剂量治疗组为 2.3 g·kg⁻¹·d⁻¹;中剂量治疗组为 4.6 g·kg⁻¹·d⁻¹;高剂量治疗组为 9.2 g·kg⁻¹·d⁻¹。西药组予以艾迪莎灌胃,给药剂量为 0.40 g·kg⁻¹·d⁻¹。对照组和模型组给予相同体积的生理盐水。以上各组均使用口腔灌胃针灌胃,每日一次,连用 7d。

1.5.3 小鼠一般情况观察 每日观察并记录各组小鼠体重、耗食量、粪便性状、活动度、精神状态及死亡率等情况变化。

1.5.4 标本采集 小鼠末次给药 24 h 后脱颈椎法处死,剪取小鼠肛门至盲肠部组织,沿其系膜纵行切开,以生理盐水冲洗后用滤纸吸干,肉眼观察大鼠结肠组织大体形态变化,并在病变严重处选取部分结肠组织,10%福尔马林溶液中固定,脱水、石蜡包埋,制备 4 μm 连续切片,行 HE 染色镜下观察炎症和溃疡情况。另一部分结肠组织分装 -80℃ 冰箱冻存,分别用于 occludin、claudin-1 蛋白及 mRNA 的检测。

1.5.5 Western blot 法检测结肠组织 occludin、claudin-1 蛋白的相对表达水平 先于液氮中研磨、裂解结肠组织,离心收集上清液,提取总蛋白,再用 BCA 法测定总蛋白浓度进行蛋白定量。取 40 μg 的总蛋白上样量,以浓度为 10%和 15% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离。以恒定电流(300 mA)在冰水浴中进行湿法转膜 1.5 h,封闭于浓度为 5%的脱脂奶粉中 1 h,使用稀释度 1:1000 的一抗,4℃ 孵育过夜。TBS-T 洗涤,与稀释浓度 1:4000 的二抗孵育 2h,加 ECL 化学发光试剂后在暗房中进行显影、定影,并利用 Image Pro Plus 进行灰度值半定量分析,以 GAPDH 的条带灰度值标化各组相应蛋白的表达水平。

1.5.6 RT-PCR 法检测结肠组织 R-occludin、R-claudin-1 的表达 取约 100 mg 结肠组织放入有少量液氮的研钵中敲碎,预冷的广口枪头将组织转移至匀浆器中匀浆,加入 1 mL TRIzol 震荡混匀使充分裂解,转移至 1.5 mL EP 管中备用;提取结肠组织的总 RNA;按照 AMV 逆转录试剂盒操作说明书进行逆转录后,于 4℃ 冰箱保存。扩增条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火延伸 30s,共 40 循环。2%琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像仪观察,用 BandScan 5.0 软件测定条带灰度值,将各 mRNA 表达水平分别与 β-actin mRNA 灰度值的比值作为观察指标,进行统计学分析。扩增引物如下表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Gene	Upstream primer	Downstream primers
Occludin	5'-TGACATGTATGCGGAGAGATG-3'	5'-CCTCGTAGATGGCCTGAGCA-3'
claudin-1	5'-CTGGGATGGATCGGCTCTATC-3'	5'-CCTCGTAGATGGCCTGAGCA-3'
GAPDH	5'-AGGGCTGCCTTCTCTTGTA-3'	5'-AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA-3'

1.6 统计学处理

本实验的数据采用 SPSS 22.0 软件处理和分析,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)对计量资料进行描述,多组间比较采用 F 分析,

组间两两比较采用 LST 检验,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况观察

正常组小鼠在实验期间饮食正常、反应灵敏、粪便呈条状或颗粒状,体重增加。与正常组相比,模型组小鼠饮食减少,体重下降,反应迟钝,胆怯聚集,粪便为稀便伴脓液或鲜血便,肛门红肿并有污秽附着。在给予相应药物治疗 3 天后,四君子汤低、中、高剂量治疗组以及西药组小鼠的饮食情况、精神状态、活动度、体重等均较模型组有一定程度的改善,以稀烂便或脓血便症状改善最明显。在实验结束时,四君子汤低、中、高剂量治疗组以及西药组小鼠血便症状基本消失,体重较实验前有所增加。

2.2 各组小鼠结肠组织的病理变化

小鼠结肠组织病理切片的镜下观察发现,正常组小鼠肠黏

膜上皮规整,上皮细胞连接紧密,可见固有层杯状细胞分泌旺盛,肠腺体排列有序,未见明显病变。模型组可见黏膜层缺损,隐窝破坏,肠上皮细胞连接松散,腺体排列紊乱,杯状细胞明显减少,间质层可见大量中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润,黏膜下层不同程度的充血、水肿。高剂量治疗组、西药组小鼠结肠组织病理形态改善明显,黏膜缺损情况较模型组均得到明显修复,上皮细胞连接较紧密,杯状细胞分泌增多,极少隐窝破坏,炎性细胞浸润不同程度降低,中剂量治疗组黏膜少量中断,缺损面积小,少量隐窝破坏,黏膜下层出现炎细胞浸润、水肿,低剂量治疗组部分黏膜中断,隐窝破坏,间质出现充血、水肿,炎细胞浸润。见图 1。

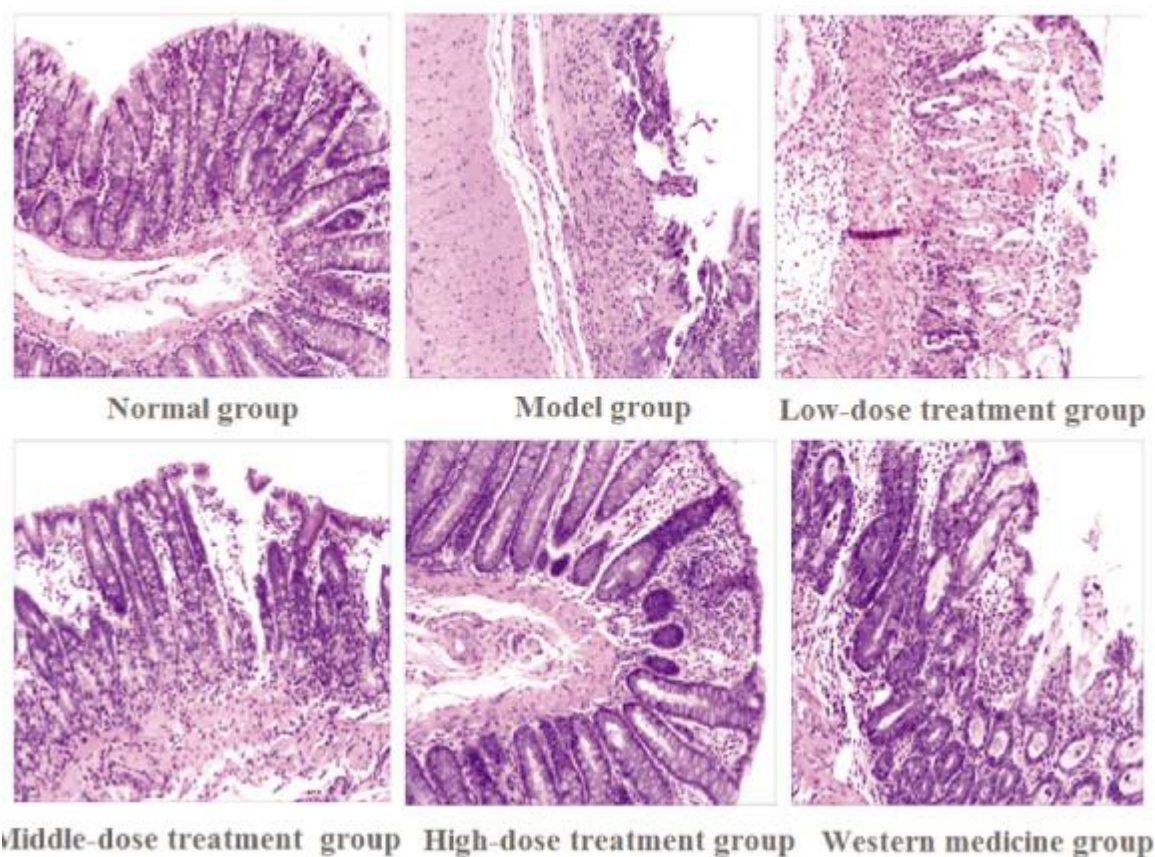


图 1 HE 染色示各组小鼠结肠组织病理改变($\times 100$)

Fig.1 HE staining showed pathological changes in colon tissues of mice in each group($\times 100$)

2.3 各组结肠组织 occludin、claudin-1 蛋白相对表达水平比较

与正常组相比较,模型组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白的表达明显降低($P < 0.01$);与模型组相比较,低剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin 蛋白的表达升高($P < 0.05$),claudin-1 蛋白的表达无统计学差异($P > 0.05$);与模型组相比较,中剂量治疗组和高剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白的表达升高($P < 0.05$);与西药组相比较,低、中、高剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 蛋白的表达无统计学差异($P > 0.05$),见表 2。

2.4 各组小鼠结肠组织 occludin、claudin-1 基因转录水平变化

与正常组相比较,模型组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 mRNA 的表达明显降低($P < 0.05$);与模型组相比较,

低剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin 和 claudin-1 mRNA 的表达无统计学差异($P > 0.05$);与模型组相比较,中剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin mRNA 的表达升高($P < 0.05$),claudin-1 mRNA 的表达无统计学差异($P > 0.05$);与模型组相比较,高剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 mRNA 的表达升高($P < 0.05$);与西药组相比较,低、中、高剂量治疗组小鼠结肠组织中 occludin、claudin-1 mRNA 的表达无统计学差异($P > 0.05$),见表 3。

3 讨论

UC 作为病因未明的临床常见难治性疾病,近年来其发病率在国内有逐年增加趋势^[10,11]。UC 是在遗传易感性的基础上,

综合环境、免疫异常等多因素所致^[12-14],其特异性病因和具体发病机制尚未十分明确。大量文献证实^[15-17],UC 肠上皮细胞凋亡增加及肠黏膜屏障受损是其主要病理改变,因此,如何保持黏

膜屏障完整、维持黏膜屏障稳态及其功能,对于预防与控制 UC 十分关键。

表 2 各组 occludin、claudin-1 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of occludin and claudin-1 protein expression levels in different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	occludin	claudin-1
Normal group	20	1.01± 0.43	1.03± 0.47
Model group	20	0.45± 0.28 [#]	0.61± 0.23 [#]
Low-dose treatment group	20	0.68± 0.32 [*]	0.75± 0.34
Middle-dose treatment group	20	0.71± 0.33 [*]	0.86± 0.35 [*]
High-dose treatment group	20	0.90± 0.31 [*]	0.95± 0.38 [*]
Western medicine group	20	0.77± 0.32	0.80± 0.31

Note: Compared with model group, ^{*}P<0.05; Compared with normal group, [#]P < 0.05.

表 3 各组 occludin、claudin-1 mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of occludin and claudin-1 mRNA expression levels in different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	occludin	claudin-1
Normal group	20	2.31± 1.04	2.17± 1.02
Model group	20	1.27± 0.72 [#]	1.41± 0.68 [#]
Low-dose treatment group	20	1.78± 0.91	1.66± 0.82
Middle-dose treatment group	20	1.86± 0.93 [*]	1.86± 0.97
High-dose treatment group	20	2.23± 0.98 [*]	2.08± 0.96 [*]
Western medicine group	20	2.26± 0.85	1.93± 0.81

Note: Compared with model group, ^{*}P<0.05; Compared with normal group, [#]P<0.05.

益气健脾方药四君子汤由党参、茯苓、白术、甘草组成,是治疗脾虚证的经典方剂^[18],四君子汤可恢复细胞膜、细胞连接的亚细胞结构从而修复肠上皮细胞病理损伤^[19],同时有促进修复 uc 肠道菌失调,发挥拮抗结肠炎症的作用^[20]。我们前期实验研究证实四君子汤能通过调控端粒酶活性,延缓肠黏膜细胞凋亡,保护 DSS 小鼠 uc 模型结肠组织受损肠黏膜屏障。肠黏膜屏障包括上皮屏障(机械屏障)、生物屏障、免疫屏障、化学屏障组成,上皮屏障是肠黏膜屏障的首道重要防线^[21-23]。其中,细胞间最重要的连接方式——紧密连接(tight junction, TJ),在细胞侧空间形成首要屏障,发挥重要调控作用,维持肠黏膜上皮屏障功能的完整性^[24,25]。紧密连接复合体结构主要由咬合蛋白(occludin)和闭合蛋白(claudin)跨膜蛋白家族及周膜蛋白紧密连接蛋白 ZO 家族 3 种超家族蛋白构成^[26,27],紧密连接蛋白通过调节肠道通透性,有效阻止肠腔内细菌、内毒素及炎性介质等物质的细胞旁转运,与 UC 的发病密切相关。Occludin 蛋白是紧密连接中最重要的结构蛋白,不仅能通过外环以拉链式结合进而产生严密的细胞旁封闭,还能与不同的分子结合,参与紧密连接形成的信号调节^[28,29],claudin-1 作为上皮细胞紧密连接跨膜蛋白,由 1 个细胞内环和 2 个细胞外环构成,通过外环,相邻的肠上皮细胞以“拉链”结构形成封闭。研究表明,紧密连接相关蛋白 occludin、claudin 表达下调,肠道通透性增加,导致肠腔内的细菌、抗原物质移位激活免疫细胞,进而诱导免疫反

应,是 UC 发生的重要机制之一^[30]。因此,occludin 蛋白、claudin-1 蛋白表达水平可以反映常粘膜屏障的受损与修复情况,是治疗 UC 的重要靶点。

本实验研究表明,UC 模型组小鼠结肠组织 occludin、claudin-1 蛋白、mRNA 表达水平均明显低于正常组,经高剂量四君子汤治疗一周后,occludin、claudin-1 蛋白、mRNA 表达均明显升高,并与西药组比较无明显差异,同时,四君子汤与 uc 模型小鼠的 occludin、claudin-1 蛋白、mRNA 表达的升高存在一定的量效关系。提示 DSS 法诱导小鼠 UC 的发病与 occludin、claudin-1 蛋白、mRNA 表达水平的下调有关,中药四君子汤方可能通过增强 UC 小鼠结肠 occludin、claudin-1、mRNA 的表达这一关键作用靶点,维持 UC 肠上皮紧密连接的完整性和稳定性、修复肠黏膜屏障功能,这可能是四君子汤治疗 UC 的有效机制之一。

综上所述,四君子汤可以改善脓血便等症状,缓解肠粘膜的损伤,上调 occludin 和 claudin-1 的表达,对 UC 小鼠有治疗作用。

参考文献(References)

- [1] Jitsumura M, Cunningham AL, Hitchings MD, et al. Protocol for faecal microbiota transplantation in ulcerative colitis (FMTUC): a randomised feasibility study[J]. BMJ Open, 2018, 8(10): e021987
- [2] Wu D, Yang Z, Zhao C, et al. Infliximab versus cyclosporine for severe ulcerative colitis refractory to steroids: A protocol for systematic

- review and meta-analysis [J]. *Medicine* (Baltimore), 2018, 97(41): e12657
- [3] Wang CS, Li WB, Wang HY, et al. VSL#3 can prevent ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(37): 4254-4262
- [4] Yamamoto T, Iida T, Ikeya K, et al. Correction: A multicenter retrospective study aiming to identify patients who respond well to adsorptive granulomonocytapheresis in moderately to severely active ulcerative colitis[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2018, 9(10): 192
- [5] Schirmer M, Denson L, Vlamakis H, et al. Compositional and Temporal Changes in the Gut Microbiome of Pediatric Ulcerative Colitis Patients Are Linked to Disease Course [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24(4): 600-610
- [6] François D, Arocas V, Venisse L, et al. Hematopoietic protease nexin-1 protects against lung injury by preventing thrombin signaling in mice [J]. *Blood Adv*, 2018, 2(18): 2389-2399
- [7] Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, et al. Estrogen/GPR30 Signaling Contributes to the Malignant Potentials of ER-Negative Cervical Adenocarcinoma via Regulation of Claudin-1 Expression[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(10): 1083-1093
- [8] 辛群,孙擎,葛现才,等.参苓白术散与美沙拉嗪对溃疡性结肠炎患者血清 IL-17、IL-23 及 TNF- α 水平的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(9): 1663-1665
- [9] 任彦,王文荣,林瑜,等.溃疡性结肠炎中医治疗方案优化研究[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(10): 2481-2484
- [10] Guardiola J, Lobatón T, Cerrillo E, et al. Recommendations of the Spanish Working Group on Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU) on the utility of the determination of faecal calprotectin in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2018, 41(8): 514-529
- [11] 陈璐.溃疡性结肠炎发病机制的研究进展[J]. *疑难病杂志*, 2016, 15(6): 650-654
- [12] 周爱芳. 活动期溃疡性结肠炎行综合护理干预对患者的心理影响 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2016, 21(1): 156-158
- [13] Youssef T, Saleh SA, Rund A, et al. Evaluation of interleukin 23 (IL-23) as a non-invasive test of disease severity in patients with ulcerative colitis[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2018, 19(3): 116-120
- [14] Xia SL, Lin DP, Lin QR, et al. A Case-Control Study on Association of Ulcerative Colitis with FCGR2A Gene Polymorphisms in Chinese Patients[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2018, 22(10): 607-614
- [15] Zang J, Ma S, Wang C, et al. Screening for active constituents in Turkish galls against ulcerative colitis by mass spectrometry guided preparative chromatography strategy: in silico, in vitro and in vivo study[J]. *Food Funct*, 2018, 9(10): 5124-5138
- [16] Klepp P, Tollisen A, Røseth A, et al. Real-life chromoendoscopy for dysplasia surveillance in ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(35): 4069-4076
- [17] Messal N, Fernandez N, Dayot S, et al. Ectopic expression of OX1R in ulcerative colitis mediates anti-inflammatory effect of orexin-A[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(11): 3618-3628
- [18] 梁华,王燕,李奇玮,等.四君子汤补脾益气的主要有效成分与系统生物学刍议[J]. *中医药学报*, 2017, 45(06): 96-99
- [19] 齐馨馨,梁凌,胡小军,等.健脾益气法治疗重症胃肠功能障碍的临床疗效[J]. *医学综述*, 2018, 24(14): 2899-2902
- [20] 唐华羽,李玉芝,李长德,等.四君子汤总多糖对小鼠肠道菌群及免疫功能的影响[J]. *陕西中医*, 2016, 37(12): 1688-1691
- [21] Gao X, Miao R, Tao Y, et al. Effect of Montmorillonite powder on intestinal mucosal barrier in children with abdominal Henoch-Schönlein purpura: A randomized controlled study[J]. *Medicine* (Baltimore), 2018, 97(39): e12577
- [22] Zhu R, Ma XC. Role of metabolic changes of mucosal layer in the intestinal barrier dysfunction following trauma/hemorrhagic shock [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(11): 1879-1884
- [23] Maria-Ferreira D, Nascimento AM, Cipriani TR, et al. Rhamnogalacturonan, a chemically-defined polysaccharide, improves intestinal barrier function in DSS-induced colitis in mice and human Caco-2 cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12261
- [24] Annunziata P, Cioni C, Masi G, et al. Fingolimod reduces circulating tight-junction protein levels and in vitro peripheral blood mononuclear cells migration in multiple sclerosis patients [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15371
- [25] Fahey JK, Williams SM, Tyagi S, et al. The Intercellular Tight Junction and Spontaneous Coronary Artery Dissection [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(14): 1752-1753
- [26] Sharma R, Gulia R, Bhattacharyya S. A Critical Role for Sorting Nexin 1 in the Trafficking of Metabotropic Glutamate Receptors[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(40): 8605-8620
- [27] Le Y, Zhang S, Ni J, et al. Sorting nexin 10 controls mTOR activation through regulating amino-acid metabolism in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 666
- [28] 张慧利,罗序睿,李爱连,等.大鼠心脏骤停心肺复苏后脑 Occludin 蛋白表达及其对血脑屏障的影响[J]. *中国医药*, 2016, 11(4): 506-510
- [29] 石永言,富建华,姚丽,等.维生素 D 调节坏死性小肠结肠炎新生大鼠肠道上皮 occludin 蛋白表达的研究[J]. *中国小儿急救医学*, 2017, 24(1): 60-64
- [30] 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