

四神丸挥发油对慢性溃疡性结肠炎小鼠TLR/MyD88 信号通路的调控作用

黄佳琦¹, 蒋青青¹, 钟友宝^{1,2}, 王梦雪¹, 龙健¹, 赵海梅^{3*}, 刘端勇⁴

(1. 江西中医药大学 研究生院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学 动物科技中心, 南昌 330004;
3. 江西中医药大学 中医学院, 南昌 330004; 4. 江西中医药大学 方证研究中心, 南昌 330004)

[摘要] 目的:从Toll样受体(TLR)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路,探讨四神丸挥发油有效治疗慢性溃疡性结肠炎的可能机制。方法:将BALB/c小鼠随机分成正常组,模型组,四神丸挥发油组,二神丸挥发油组,五味子散挥发油组和美沙拉嗪组,采用葡聚糖硫酸钠(DSS)建立慢性溃疡性结肠炎小鼠模型,灌胃给药7 d后,通过体质量、结肠质量、结肠质量指数、结肠长度、结肠镜下损伤评分评价其疗效;用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测结肠组织上清液中白细胞介素-4(IL-4),白细胞介素-10(IL-10),白细胞介素-17A(IL-17A),白细胞介素-21(IL-21)和 γ 干扰素(IFN- γ)水平,同时用蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测各组小鼠结肠黏膜中TLR/MyD88信号通路相关蛋白,包括TLR2,MyD88,Ras相关的C3肉毒素底物1(Rac1),白细胞介素-1受体相关激酶4(IRAK4),白细胞介素-1受体相关激酶1(IRAK1),肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6),转化生长因子- β 活化激酶1结合蛋白1(TAB1),转化生长因子- β 活化激酶1结合蛋白2(TAB2),丝裂原活化蛋白激酶激酶6(MKK6),p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)和环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)的表达水平。结果:与正常组比较,模型组结肠长度显著降低,结肠质量、结肠质量指数和结肠镜下病理损伤评分均显著升高,IL-10水平显著降低,IL-4,IL-21和IFN- γ 水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),TLR2,MyD88,Rac1,IRAK4,IRAK1,TRAF6,TAB1,TAB2,MKK6,p38 MAPK和CREB蛋白表达量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,经四神丸挥发油干预后,小鼠结肠长度显著增加,结肠质量、结肠质量指数和结肠镜下病理损伤评分均显著降低,且小鼠结肠组织中IL-10水平明显升高,而IL-4,IL-17A,IL-21和IFN- γ 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),同时小鼠结肠组中TLR2,MyD88,Rac1,IRAK4,IRAK1,TRAF6,TAB1,TAB2,MKK6,p38 MAPK和CREB蛋白表达量均明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:四神丸挥发油能有效改善慢性溃疡性结肠炎的炎性损伤,可能是通过抑制TLR/MyD88信号通路实现的。

[关键词] 四神丸挥发油; 溃疡性结肠炎; Toll样受体(TLR)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路; 疗效

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0019-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212301

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211018.1142.003.html>

[网络出版日期] 2021-10-18 17:25

Regulatory Effect of Volatile Oil from Sishenwan on TLR/MyD88 Signaling Pathway in Mice with Chronic Ulcerative Colitis

HUANG Jia-qi¹, JIANG Qin-qin¹, ZHONG You-bao^{1,2}, WANG Meng-xue¹, LONG Jian¹,
ZHAO Hai-mei^{3*}, LIU Duan-yong⁴

(1. Department of Postgraduate, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. Laboratory Animal Research Center for Science and Technology, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 4. Prescription and Syndrome Research Center of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[收稿日期] 20210605(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82060838,82060799);江西省自然科学基金项目(20202ACBL206026,20192ACB20015,20202ACBL206028,20181BAB205082);江西省教育厅科技项目(GJJ196049);江西省研究生创新专项(研字[2020]39号)

[第一作者] 黄佳琦,在读硕士,从事炎症性肠病中医药治疗与作用机制研究,E-mail:583960690@qq.com

[通信作者] *赵海梅,博士,教授,博士生导师,从事方剂配伍与免疫药理研究,E-mail:haimei79@163.com

[Abstract] **Objective:** To explore the underlying mechanism of volatile oil from Sishenwan in treating chronic ulcerative colitis through the Toll-like receptor (TLR)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88) signaling pathway. **Method:** The BALB/c mice were randomly divided into a normal group (normal), a model group [dextran sodium sulfate (DSS)], a Sishenwan volatile oil group, an Ershen pill volatile oil group, a Wuweizi powder volatile oil group, and a mesalazine control group. The chronic ulcerative colitis model was induced by DSS in mice. Seven days after intragastric administration, the efficacy was evaluated based on the body weight, colon weight, colon weight index, colon length, and pathological damage score under colonoscopy. The levels of interleukin (IL)-4, IL-10, IL-17A, IL-21, and interferon- γ (IFN- γ) in the supernatant of colon tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the expression levels of proteins related to the TLR/MyD88 signaling pathway in the colon mucosa of mice, including TLR2, MyD88, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4), IRAK1, tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6), transforming growth factor- β -activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1), TAB2, mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), and cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (CREB). **Result:** Compared with the normal group, the model group showed decreased colon length, increased colon weight, colon weight index, and pathological damage score under colonoscopy, decreased IL-10 level in the colon tissues, increased IL-4, IL-17A, IL-21, and IFN- γ levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and up-regulated protein expression of TLR2, MyD88, Rac1, IRAK4, IRAK1, TRAF6, TAB1, TAB2, MKK6, p38MAPK, and CREB ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Sishenwan volatile oil group showed increased colon length, reduced colon weight, colon weight index, and pathological damage score under colonoscopy, elevated IL-10 level in the colon tissues, decreased IL-4, IL-17A, IL-21, and IFN- γ levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulated protein expression of TLR2, MyD88, Rac1, IRAK4, IRAK1, TRAF6, TAB1, TAB2, MKK6, p38MAPK, and CREB ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The volatile oil from Sishenwan can effectively improve the inflammatory response of chronic ulcerative colitis, which may be achieved by regulating the TLR/MyD88 signaling pathway.

[Keywords] volatile oil from Sishenwan; ulcerative colitis; Toll-like receptor (TLR)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88) signaling pathway; efficacy

溃疡性结肠炎(UC)是一种累及直肠和结肠的慢性非特异性炎症肠病,以腹痛、腹泻、大便脓血为主要临床表现症状,其发病机制尚不明确。研究表明,Toll样受体(TLR)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路在肠道黏膜受损过程中一直处于高度激活的状态,与UC发病密切相关^[1]。TLRs能够通过病原识别模式分子结合的方式,介导其下游的信号传递分子MyD88进行胞内信号转导,导致核转录因子的激活和转位,大量产生致炎因子,从而破坏肠道免疫稳态,最终导致UC的发病^[2]。

四神丸是出自于明代王肯堂《证治准绳》的经典方剂,具有温肾健脾,涩肠止泻之功,可治疗脾肾阳虚之五更泻,现代临床上常用于治疗UC、肠易激综合征等多种肠道疾病^[3-4]。挥发油是四神丸发挥疗效的主要有效成分,方中补骨脂、肉豆蔻、五味子和吴茱萸均是挥发油含量较高的种仁类药物,富含

多种药理活性成分,能够通过不同靶点有效改善UC症状。本文从四神丸方中提取了各药物的挥发油成分,按照原方配比制备了四神丸挥发油,并通过观察TLR/MyD88信号通路的活化情况,探索四神丸挥发油治疗UC的可能作用机制,为四神丸的新药研发提供新的参考思路。

1 材料及方法

1.1 动物 60只SPF级雄性BALB/c小鼠,体质量(22±2)g,9~12周龄,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2016-0002。饲养于江西中医药大学实验动物中心恒温、恒湿、明暗循环的环境中,给予蒸馏水和标准饲料适应性饲养3d。动物实验严格遵守江西中医药大学实验动物中心动物伦理委员会要求,批准号JZLLSC-20190180。

1.2 药物 四神丸由补骨脂12g(批号1808005),

肉豆蔻 6 g (批号 1820204), 五味子 6 g (批号 1810006), 吴茱萸 3 g (批号 150522) 组成; 二神丸由补骨脂 12 g, 肉豆蔻 6 g 组成; 五味子散由五味子 6 g, 吴茱萸 3 g 组成, 以上中药饮片均购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 由江西中医药大学中药鉴定教研室葛菲教授鉴定符合 2020 年版《中华人民共和国药典》项下规定。采用超声辅助水蒸气蒸馏法提取挥发油^[5-6], 准确称取补骨脂、肉豆蔻各 360 g, 五味子 300 g, 吴茱萸 1 200 g, 分别加入圆底烧瓶中, 其中肉豆蔻和五味子需粉碎过筛后加入, 加入相应体积的蒸馏水, 连接上挥发油提取器、冷凝管等, 自冷凝管上端加蒸馏水至溢出挥发油提取器支口, 浸泡 1 h 后, 将圆底烧瓶放入超声波清洗器中进行超声处理, 随后旋蒸提取至挥发油体积无明显变化, 分别得到 0.6 mL 的补骨脂挥发油, 11.3 mL 的肉豆蔻挥发油, 1.1 mL 的吴茱萸挥发油及 4.3 mL 的五味子挥发油, 按照小鼠体表面积分别换算四神丸、二神丸及五味子散三方中单味药的小鼠灌胃剂量, 结合挥发油提取浓度计算单味药挥发油的日灌胃剂量, 按照三方的原方药物配伍比例分别配制得到四神丸挥发油、二神丸挥发油及五味子散挥发油, 过滤除菌后于 4 °C 保存, 实验前以 2% 的聚山梨酯-80 溶解至适量浓度备用。美沙拉嗪肠溶片 (葵花药业佳木斯鹿灵制药有限公司, 批号 200818)。

1.3 试剂 葡聚糖硫酸钠 (DSS, 美国 MP Biomedicals 公司, 批号 Q5756); 苏木素-伊红 (HE) 染液 (南京建成科技有限公司, 批号 20200605); 白细胞介素-4 (IL-4), IL-10, IL-17A, IL-21, γ 干扰素 (IFN- γ) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号分别为 88-7044-88, 88-7105-88, 88-7371-88, 88-8210-88, 88-7314-88); TLR2, 白细胞介素-1 受体相关激酶 4 (IRAK4), IRAK1, 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6), 转化生长因子- β 活化激酶 1 结合蛋白 1 (TAB1), Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Rac1), 丝裂原活化蛋白激酶激酶 6 (MKK6), MyD88, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 山羊抗兔、山羊抗小鼠抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab209216, ab119942, ab238, ab40675, ab76412, ab33186, ab154901, ab2064, ab181602, ab205718, ab205719); p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) (D13E1), 环磷腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) (48H2), TAB2 (C88H10) 抗体 (美国 Cell Signaling 公司, 批号分别为 8690S, 9197S, 3745S)。

1.4 仪器 EG1150H 型石蜡包埋机, RM2255 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); BX43 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); VCX150 型组织超声匀浆机 (美国 Sonic 公司); Varios-kan Flash 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 041BR137750 型电泳仪, Mini PROTEAN Tera Cell 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); FluorChem M 型凝胶成像系统 (美国 Protein Simple 公司)。

2 方法

2.1 慢性 UC 模型复制 除正常组外, 其余 5 组小鼠参照经典小鼠 UC 模型建立方法^[7]稍加修改, 均给予 3% DSS 溶液自由饮用 5 d, 然后给予蒸馏水恢复 7 d 后, 再给予 2% DSS 溶液复发炎症 5 d, 以成功复制慢性复发性 UC 模型。整个实验期间各组小鼠均自由进食。

2.2 给药治疗 以小鼠第 1 次饮用 3% DSS 为第 1 天, 其余 5 组在第 11 天开始按照小鼠体质量灌胃给药。根据《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》及参考前期预实验结果确定各组小鼠灌胃给药剂量分别为四神丸挥发油组 ($0.075 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 二神丸挥发油组 ($0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 五味子散挥发油 ($0.025 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 美沙拉嗪 ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 正常组与模型组给予同等体积蒸馏水灌胃。每日 1 次, 固定时间灌胃, 连续 10 d。

2.3 疾病活动评价 自造模之日起, 每天在固定时间对各组小鼠称质量记录并观察饮食、精神状态、毛发、活动度、大便性状的变化, 用粪便潜血试纸检测大便隐血, 评分并记录。计算每只小鼠的疾病活动指数 (DAI), 具体评分标准见表 1^[8], DAI 总分 = 体质量下降百分数评分 + 粪便黏稠度评分 + 粪便隐血评分。

表 1 疾病活动指数评分

Table 1 Disease activity index score

评分	体质量下降百分数 (%)	粪便黏稠度	粪便隐血
0	<1	正常	无
1	1~5	-	-
2	6~10	松软	+
3	11~20	-	粪便带血
4	>20	水样便	肛门出血

2.4 样品采集 末次给药后小鼠禁食 12 h, 称质量, 用 3% 戊巴比妥钠深度麻醉后安乐死。解剖, 分离结肠组织, 置于冰块上测量其长度并拍照记录, 用冰冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液灌注冲洗结肠内容

物,用滤纸吸干,称取结肠质量,并计算结肠质量指数(结肠质量指数=结肠质量/小鼠体质量×100%)。

2.5 HE染色观察结肠组织病理学变化 剪取距肛门4 cm处的2 cm结肠组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,24 h后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成5 μm厚的组织切片,常规HE染色,中性树胶封片,光镜下观察结肠组织病理变化。

2.6 ELISA法检测结肠组织相关细胞因子含量 称取小鼠结肠约200 mg,按照1:10的比例加入RIPA高效裂解液,4℃孵育1 h,超声匀浆机低温匀浆20 min,以4℃条件下13 000 r·min⁻¹离心30 min(离心半径7 cm),取上清液。按照ELISA试剂盒说明书步骤操作,采用酶标仪于450 nm波长下测定吸光度A,检测小鼠结肠组织匀浆中IL-4, IL-17A, IL-21和IFN-γ水平。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白分子表达 取结肠组织匀浆液,加入RIPA裂解液,COCKTAIL及PMSF蛋白酶抑制剂,13 000 r·min⁻¹离心40 min(离心半径7 cm)。取离心后的组织上清液20 μL,采用BCA法测定其蛋白浓度,根据目标蛋白的分子量选择并制备相应的分离胶和浓缩胶,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,湿法转膜,脱脂奶粉封闭后,分别用5%BSA按1:1 000的比例稀释GAPDH, TLR2, MyD88, Rac1, IRAK4, IRAK1, TRAF6, TAB1, TAB2, MKK6, p38 MAPK, CREB抗体,4℃摇床孵育过夜,加入用5%BSA按1:1万稀释的免疫球蛋白(Ig)G二抗,室温反应2 h,ECL超敏溶液显影,采用Image J 1.52v图像处理软件计算

对应凝胶条带的灰度值,与内参GAPDH的灰度值比值用于统计分析。

2.8 统计学分析 运用SPSS 23.0及GraphPad Prism 8.0统计软件进行数据统计分析,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多质量比较采用Tukey检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对UC小鼠的疗效评价的影响 与正常组比较,模型组小鼠体质量显著下降,结肠质量指数显著升高,结肠长度显著缩短($P<0.01$);与模型组比较,四神丸挥发油组结肠质量明显恢复,结肠质量指数显著下降($P<0.01$),结肠长度趋于正常($P<0.01$),五味子散挥发油组及美沙拉嗪组变化趋势与四神丸挥发油组基本一致,二神丸挥发油组结肠长度恢复趋势差异无统计学意义。见表2。

正常组小鼠结肠黏膜及上皮结构完整,结构正常,腺体排列规则,无充血水肿,未见炎性细胞浸润,无变性坏死。模型组小鼠肠黏膜下层充血、水肿,黏膜下层和固有层分离,隐窝肿胀变形,杯状细胞破坏,溃疡形成,伴大量炎性细胞浸润。四神丸挥发油组、五味子散挥发油组及美沙拉嗪组小鼠结肠黏膜较薄,黏膜下层和肌层轻微水肿,少量炎性细胞浸润,黏膜腺体结构存在轻微损伤但排列整齐。二神丸组小鼠肠黏膜下层可见较为明显的充血水肿,杯状细胞存在部分破坏,有部分溃疡形成。上述结果提示四神丸挥发油对DSS诱导的小鼠UC有明显的疗效,且总体优于其他治疗组。见图1。

表2 四神丸挥发油对UC小鼠的疗效评价的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

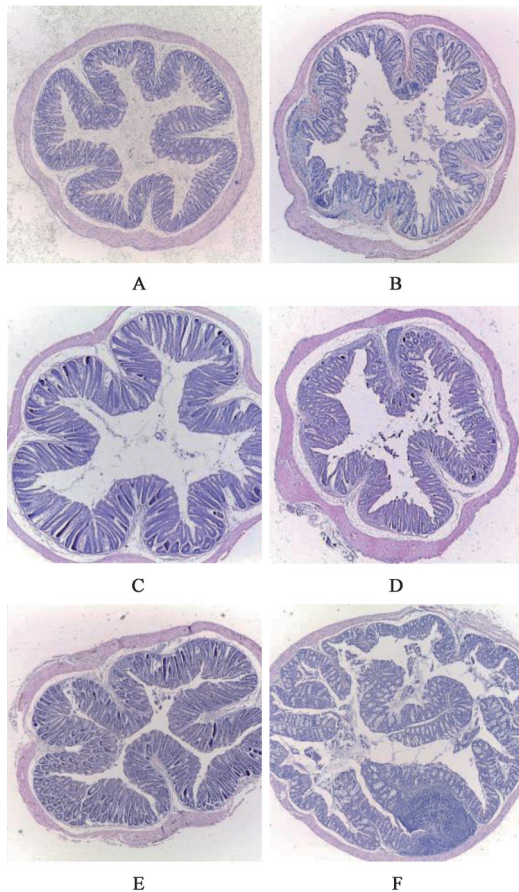
Table 2 Effect of volatile oil from Sishenwan on UC mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量/g	结肠长度/cm	结肠质量/g	单位长度质量/g·cm ⁻¹ ·100%	结肠质量指数/%	末次DAI评分/分
正常		29.30±1.04	12.30±0.62	0.42±0.05	3.45±0.44	1.46±0.21	0.11±0.33
模型		26.27±1.47 ²⁾	10.50±0.97 ²⁾	0.51±0.07 ²⁾	4.91±0.78 ²⁾	1.84±0.24 ²⁾	1.57±1.62 ²⁾
四神丸挥发油	0.075	28.86±0.93 ⁴⁾	12.23±1.02 ⁴⁾	0.42±0.03 ⁴⁾	3.45±0.26 ⁴⁾	1.51±0.15 ⁴⁾	0.22±0.67 ⁴⁾
二神丸挥发油	0.05	17.30±4.55 ⁴⁾	8.47±2.73	0.39±0.13 ³⁾	4.74±0.21	2.14±0.12 ³⁾	2.86±3.18
五味子散挥发油	0.025	27.40±2.59	11.62±0.73 ³⁾	0.45±0.07 ³⁾	4.01±0.64 ³⁾	1.62±0.10 ³⁾	0.25±0.71 ³⁾
美沙拉嗪	0.3	27.70±1.23	12.45±0.71 ⁴⁾	0.44±0.02 ³⁾	3.51±0.27 ⁴⁾	1.61±0.08 ³⁾	0.38±0.74

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3,4同)。

3.2 对UC小鼠细胞因子水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中IL-4,IL-21的水平明显增高,IL-10与IFN-γ的水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,各治疗组小鼠IL-4,IL-17A,IL-21炎症因子的水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),

二神丸挥发油组与美沙拉嗪组小鼠IL-10水平无明显升高趋势,二神丸挥发油组、五味子散挥发油组与美沙拉嗪组小鼠IFN-γ水平仅有上升趋势,但差异无统计学意义,提示四神丸挥发油可有效调节UC小鼠结肠组织中抗炎因子和促炎因子之间平



A. 正常组; B. 模型组; C. 四神丸挥发油组; D. 二神丸挥发油组; E. 五味子散挥发油组; F. 美沙拉嗪组(图2同)

图1 四神丸挥发油对UC小鼠结肠组织病理学评分的影响(HE, ×40)

Fig. 1 Effect of volatile oil from Sishenwan on colonic histopathological score of UC mice (HE, ×40)

衡。见表3。

3.3 对UC小鼠TLR/MyD88信号通路蛋白的影响

与正常组比较,模型组小鼠TLR2, Rac1, MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF6, TAB1, TAB2, MKK6, p38MAPK, CREB蛋白表达均显著增加($P < 0.01$);提示TLR/MyD88信号在DSS诱导的UC中被激活。与模型组比较,各挥发油组与美沙拉嗪组小鼠

表3 四神丸挥发油对UC小鼠细胞因子表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of volatile oil from Sishenwan on cytokine expression in UC mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-4	IL-10	IL-17A	IL-21	IFN- γ
正常		36.39±11.03	1 659.10±372.18	8.29±5.04	1 552.19±426.49	149.79±15.04
模型		49.22±5.93 ²⁾	1 251.79±159.20 ²⁾	11.35±4.73	2 026.72±164.96 ¹⁾	96.68±4.99 ²⁾
四神丸挥发油	0.075	41.39±5.29 ⁴⁾	1 519.78±157.75 ⁴⁾	2.97±1.04 ⁴⁾	1 444.84±158.11 ⁴⁾	113.11±11.64 ⁴⁾
二神丸挥发油	0.05	35.99±6.27 ⁴⁾	1 250.24±157.75	6.31±2.86 ³⁾	1 486.58±281.77 ⁴⁾	100.24±8.16
五味子散挥发油	0.025	36.16±7.28 ⁴⁾	1 477.49±161.18 ³⁾	5.48±2.95 ⁴⁾	1 428.23±249.30 ⁴⁾	110.97±19.66
美沙拉嗪	0.3	40.81±5.85 ⁴⁾	1 267.45±131.83	4.08±2.24 ⁴⁾	1 494.68±303.75 ⁴⁾	103.76±19.90

TLAF6, Rac1, MyD88, IRAK4, IRAK1, TAB1, MKK6, p38MAPK蛋白表达均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),四神丸挥发油、五味子散挥发油和美沙拉嗪组TLR2和CREB蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),四神丸挥发油组和美沙拉嗪组TAB2蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),二神丸挥发油组TAB2蛋白表达升高,五味子散挥发油组TAB2蛋白水平差异无统计学意义,但有明显下降趋势。见图2,表4。

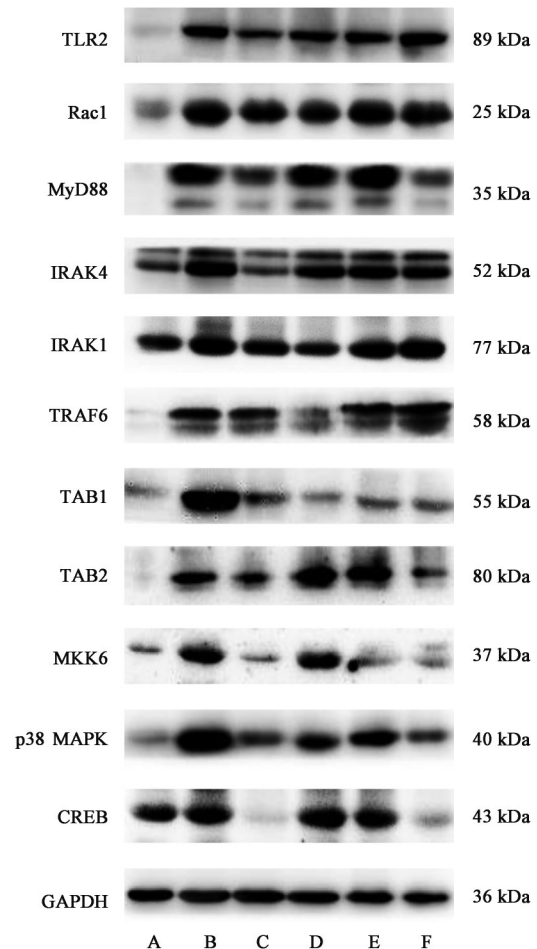


图2 各组小鼠结肠组织TLR/MyD88信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of expression level of TLR/MyD88 signaling pathway related proteins

表 4 四神丸挥发油对 TLR/MyD88 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of volatile oil from Sishenwan on TLR/MyD88 signal path related protein expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR2/GAPDH	Rac1/GAPDH	MyD88/GAPDH	IRAK4/GAPDH	IRAK1/GAPDH	TRAF6/GAPDH
正常		0.38±0.15	0.32±0.23	0.39±0.23	0.40±0.16	0.71±0.41	0.37±0.16
模型		0.82±0.05 ²⁾	0.88±0.11 ²⁾	1.04±0.19 ²⁾	0.97±0.05 ²⁾	1.14±0.14 ²⁾	0.92±0.08 ²⁾
四神丸挥发油	0.075	0.60±0.18 ⁴⁾	0.53±0.02 ⁴⁾	0.70±0.16 ⁴⁾	0.62±0.09 ⁴⁾	0.88±0.28 ³⁾	0.62±0.24 ⁴⁾
二神丸挥发油	0.05	0.78±0.07	0.63±0.15 ⁴⁾	0.81±0.06 ⁴⁾	0.82±0.06 ⁴⁾	0.70±0.44 ⁴⁾	0.72±0.24 ³⁾
五味子散挥发油	0.025	0.77±0.03 ³⁾	0.70±0.20 ³⁾	0.83±0.09 ³⁾	0.78±0.15 ⁴⁾	0.80±0.38 ³⁾	0.75±0.18 ³⁾
美沙拉嗪	0.3	0.53±0.30 ⁴⁾	0.38±0.25 ⁴⁾	0.52±0.55 ³⁾	0.46±0.25 ⁴⁾	0.52±0.33 ⁴⁾	0.33±0.20 ⁴⁾

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TAB1/GAPDH	TAB2/GAPDH	MKK6/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	CREB/GAPDH
正常		0.65±0.29	0.12±0.04	0.42±0.12	0.57±0.22	0.30±0.08
模型		1.08±0.09 ²⁾	0.61±0.09 ²⁾	0.84±0.12 ²⁾	1.03±0.08 ²⁾	0.80±0.20 ²⁾
四神丸挥发油	0.075	0.51±0.04 ⁴⁾	0.47±0.06 ⁴⁾	0.41±0.11 ⁴⁾	0.67±0.12 ⁴⁾	0.48±0.02 ⁴⁾
二神丸挥发油	0.05	0.54±0.26 ⁴⁾	0.71±0.05	0.64±0.11 ⁴⁾	0.78±0.16 ⁴⁾	0.57±0.24
五味子散挥发油	0.025	0.66±0.25 ⁴⁾	0.56±0.16	0.66±0.15 ³⁾	0.77±0.10 ⁴⁾	0.50±0.18 ⁴⁾
美沙拉嗪	0.3	0.34±0.26 ⁴⁾	0.37±0.24 ³⁾	0.25±0.14 ⁴⁾	0.46±0.40 ⁴⁾	0.28±0.21 ⁴⁾

4 讨论

目前认为 UC 的发病机制与肠道免疫稳态、遗传以及肠道微环境等多种因素密切相关。研究发现, TLR/MyD88 信号通路在 UC 发病机制中起到质量要作用, 该通路的异常激活能够从多个方面介导 UC 的肠道免疫炎症反应。TLRs 作为一种能够介导肠黏膜先天防御反应的模式识别受体, 能够发起信号激活肠道免疫应答, 并且能够促进树突状细胞成熟, 从而启动特异性免疫应答^[9]。MyD88 是含有 TLR 结构域的接头蛋白, 是 TLR 信号通路中的下游信号因子, 在 TLR 信号通路中起关键作用^[10]。当机体受到各种病原微生物刺激后, TLRs 通过识别微生物抗原, 与 MyD88 的 TLR 结构域相互作用进行胞内信号传导, 激活下游信号通路, 促使核转录因子- κ B (NF- κ B) 的活化, 从而启动相关基因的转录, 促进炎症因子释放, 而释放的炎症因子又可反过来进一步活化 NF- κ B, 由此形成一个正反馈调节, 使炎症不断放大加深, 最终导致 UC 的发病^[11]。在本研究中, DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中 TLR/MyD88 信号通路的相关蛋白表达均显著高于正常组, 提示 TLR/MyD88 信号通路被激活。在四神丸挥发油干预后, TLR/MyD88 信号通路的相关蛋白表达均明显下降, IL-4, IL-17A, IL-21 等促炎因子的释放减少, IL-10 与 IFN- γ 等抑炎因子水平上调, 说明四神丸挥发油能够通过调节促炎因子和抑炎因子之间的平衡, 同时有效抑制 TLR/MyD88 信号通路的激活, 从而缓解 UC 的炎症反应。

四神丸最早收录于明·王肯堂《证治准绳》, 由宋·许叔微《普济本事方》中所载的二神丸(补骨脂、肉豆蔻)及五味子散(五味子、吴茱萸)组成, 是治疗脾肾阳虚泄泻的传世名方。研究表明, 四神丸方中各药均能从多个角度有效缓解 UC, 其中挥发油是主要有效部位。补骨脂中挥发油成分约为 20%, 其中主要含有补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚等^[12], 对多种免疫细胞具有调节作用, 能够抑制巨噬细胞炎症因子肿瘤坏死因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α), IL-1 β 和 IL-6 的分泌^[13], 同时能够增强树突状细胞的活性, 提高机体免疫应答, 消除炎症反应^[14]。肉豆蔻中挥发油成分约占 15%, 其中主要含有肉豆蔻醚等有效成分, 一些实验证明肉豆蔻挥发油具有显著的杀菌抑菌作用以及良好的抗氧化活性^[15-17]。吴茱萸中挥发油成分同样丰富, 其有效成分以吴茱萸烯和吴茱萸内酯为主, 有明显的抗胃溃疡作用, 与五味子配伍能够促进其有效成分在肠道的吸收^[18-20]。在前期预实验中, 验证四神丸挥发油对实验性 UC 的疗效, 并确定了有效剂量。在本研究中, 设置了二神丸挥发油组与五味子散挥发油组以探讨药物之间的配伍关系。实验结果显示, 与模型组相比, 治疗效果以四神丸挥发油为最优, 其次是五味子散挥发油, 再次为二神丸挥发油。在缓解 UC 小鼠的一般生活性状方面, 二神丸挥发油组与模型组比较出现了负增长的情况, 这可能与肉豆蔻、补骨脂挥发油中的毒性成分相关, 而本研究中四神丸挥发油并未显示出类似作用, 并且五味子散挥发油

组的治疗趋势与四神丸挥发油相同但效果稍差,这提示四神丸中有效缓解UC的药物成分可能主要来自于五味子和吴茱萸,并且药物之间的配伍对治疗起到了增效减毒的作用。

综上所述,本实验表明四神丸挥发油有效缓解慢性UC可能是通过抑制TLR/MyD88信号通路来实现的,这为四神丸挥发油治疗UC提供了新的科学证据;通过与二神丸挥发油及五味子散挥发油的对比,提示了四神丸原方配伍比例对治疗的质量要性,此外,本研究也存在部分不足之处,仅提取了单味药的挥发油组合进行疗效探讨,并未对四神丸复方挥发油进行研究,在今后的研究中将进一步对四神丸全方中有效组分及其治疗UC的作用机制进行探讨,推动四神丸的新药研究与开发。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] ZHOU J, TAN L, XIE J, et al. Characterization of brusatol self-microemulsifying drug delivery system and its therapeutic effect against dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice [J]. Drug Deliv, 2017, 24(1): 1667-1679.

[2] CHOW H, GUO D, ZHOU J, et al. CDK5 activator protein p25 preferentially binds and activates GSK3 β [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(45): E4887-4895.

[3] 刘弼,陈萍,肖鹏,等. 四神丸加味治疗腹泻型肠易激综合征临床观察[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(3): 503-505.

[4] 杨荣生,杨荣凤. 四神丸煎剂配合中药灌肠治疗溃疡性结肠炎62例[J]. 陕西中医, 2013, 34(1): 25-27.

[5] 王利利,顾晶晶,葛笑兰,等. 超声辅助水蒸气蒸馏法提取野香花精油及其抗菌活性分析[J]. 武汉轻工大学学报, 2021, 40(2): 8-13.

[6] 华燕青,李黔蜀,王云云,等. 超声辅助蒸馏法提取薄荷挥发油的研究[J]. 陕西农业科学, 2019, 65(8): 16-18.

[7] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation [J]. Nat Protoc, 2017, 12(7): 1295-1309.

[8] TOTSUKA T, KANAI T, IYAMA R, et al. Ameliorating effect of anti-inducible costimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis [J]. Gastroenterology, 2003, 124(2): 410-421.

[9] PRICE A, SHAMARDANI K, LUGO K, et al. A Map of Toll-like receptor expression in the intestinal epithelium reveals distinct spatial, cell type-specific, and temporal patterns [J]. Immunity, 2018, 49(3): 560-575.

[10] NAGPAL K, PLANTINGA T, WONG J, et al. A TIR domain variant of MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP results in loss of MyD88 binding and reduced TLR2/TLR4 signaling [J]. J Biol Chem, 2009, 284(38): 25742-25748.

[11] 刘胜楠,卢雪峰,孙娜,等. Toll样受体2、4及核因子- κ B在溃疡性结肠炎黏膜组织中的表达及临床意义 [J]. 山东大学学报:医学版, 2012, 50(2): 60-63.

[12] 谭伟. 补骨脂化学成分和药理作用研究 [D]. 上海: 东华大学, 2017.

[13] 柴丽娟,王安红,徐金虎,等. 补骨脂4种组分对LPS诱导的RAW 264.7细胞炎症因子的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(4): 360-363.

[14] 秦元华,郑莉莉,戴晓冬,等. 隐孢子虫感染小鼠MHC-II类抗原的表达 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(3): 196-200.

[15] PIARU S, MAHMUD R, ABDUL MAJID A, et al. Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia* [J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(3): 593-597.

[16] 胡杰,代娟,王城城,等. 肉豆蔻挥发油体外抗病原微生物活性研究 [J]. 成都医学院学报, 2014, 9(6): 675-678.

[17] 蒋鸣. 肉豆蔻挥发油抑菌作用研究 [J]. 中国调味品, 2021, 46(1): 63-66.

[18] 严子玲. 五味子配伍对吴茱萸肠吸收的影响机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.

[19] 杨志欣,孟永海,王秋红,等. 吴茱萸化学拆分组分的性味药理学评价——化学拆分组分止泻、止呕作用的研究 [J]. 中医药学报, 2011, 39(5): 13-16.

[20] 尹利顺,孙蓉. 吴茱萸挥发油化学成分与药理毒理研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2016, 13(3): 162-164.

[责任编辑 周冰冰]