

补中益气丸对DSS诱导的结肠炎模型小鼠不同病理阶段 NLRP3炎性体通路的影响

宋春晖¹, 游弋晖¹, 柯俊羽^{1,2}, 李耿³, 龙海珊³, 巫燕莉¹, 杜群¹, 李燕舞^{1*}, 郭文峰⁴

(1. 广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405;

2. 广州中医药大学附属高州中医院, 广东高州, 525200;

3. 广州中医药大学实验动物中心, 广州 510405; 4. 广州中医药大学青蒿研究中心, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨补中益气丸对结肠炎小鼠的干预作用及机制。方法:64只C57BL/6小鼠随机分为2周空白组、2周模型组、2周补中益气丸(12 g·kg⁻¹)组、2周补中益气丸(6 g·kg⁻¹)组、4周空白组、4周模型组、4周补中益气丸12 g·kg⁻¹组及4周补中益气丸6 g·kg⁻¹组。采用3%右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)自由饮水7 d诱导结肠炎小鼠模型,于造模后第8天开始给予补中益气丸(12、6 g·kg⁻¹)灌胃,每天1次。分别于第2、4周处死动物,测量小鼠结肠长度及质量,苏木素-伊红(HE)染色病理观察并进行结肠黏膜炎症评分,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)的mRNA和蛋白表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测结肠组织中的炎性细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18和IL-33含量。结果:与2周空白组比较,2周模型组小鼠结肠长度明显缩短、质量明显增加($P<0.05$),光镜下可见上皮细胞缺失、腺体结构破坏、黏膜及黏膜下层大量炎细胞浸润,局部出现隐窝脓肿,黏膜炎症评分显著增加($P<0.01$),结肠组织中IL-1 β 、IL-18和IL-33含量明显增高($P<0.05$),NLRP3、ASC、Caspase-1的mRNA及蛋白表达明显上升($P<0.05$);与2周模型组比较,补中益气丸(12 g·kg⁻¹)干预可恢复结肠长度,缓解黏膜损伤程度($P<0.05$),下调炎性因子IL-18含量($P<0.05$),降低NLRP3、ASC的mRNA表达和ASC、Caspase-1的蛋白表达水平($P<0.05$)。与4周空白组比较,4周模型组小鼠结肠长度明显减少,质量明显增加($P<0.05$),光镜下见黏膜层腺体减少、腺腔扩张,隐窝萎缩,局部结缔组织增生及淋巴细胞浸润,炎症评分明显升高,呈现慢性炎症阶段($P<0.01$);炎性细胞因子IL-1 β 、IL-18和IL-33表达增高($P<0.05$),NLRP3炎性体复合物的mRNA和蛋白表达水平增高($P<0.05$);与4周模型组比较,两种剂量的补中益气丸干预均可改善结肠长度及质量($P<0.05$),其中,补中益气丸(12 g·kg⁻¹)干预还可改善结肠炎症评分($P<0.05$)。与急性期不同的是,此时补中益气丸(两种剂量)干预提高肠黏膜IL-33含量并显著上调NLRP3炎性体复合物ASC、Caspase-1 mRNA及蛋白表达($P<0.05$)。结论:补中益气丸可减轻DSS模型小鼠结肠炎症损伤,其机制与调节NLRP3炎性体介导的肠道免疫反应有关,且在急、慢性炎症阶段呈现不同的调节作用。

[关键词] 补中益气丸; 结肠炎模型; NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)炎症小体; 促炎; 抑炎

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0020-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221337

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220509.1339.001.html>

[网络出版日期] 2022-05-09 16:31

Effect of Buzhong Yiqiwan on NLRP3 Inflammasome Pathway of DSS-induced Colitis Model Mice at Different Pathological Stages

SONG Chunhui¹, YOU Yihui¹, KE Junyu^{1,2}, LI Geng³, LONG Haishan³, WU Yanli¹, DU Qun¹,

LI Yanwu^{1*}, GUO Wenfeng⁴

(1. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangzhou 510405, China;

[收稿日期] 2021-12-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202627)

[第一作者] 宋春晖, 硕士, 从事肠道黏膜损伤修复机制及中药调控研究, E-mail: 635767579@qq.com

[通信作者] *李燕舞, 博士, 研究员, 从事中药药理研究, E-mail: liyanwu@gzucm.edu.cn

2. Gaozhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Gaozhou 525200, China;

3. Animal Experiment Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

4. Artemisinin Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] Objective: To explore the intervention effect and mechanism of Buzhong Yiqiwan (BZYQ) on colitis mice. **Method:** Sixty-four C57BL/6 mice were randomly divided into 2 weeks blank group, 2 weeks model group, 2 weeks high-dose BZYQ ($12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, 2 weeks low-dose BZYQ ($6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, 4 weeks blank group, 4 weeks model group, 4 weeks high-dose BZYQ ($12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and 4 weeks low-dose BZYQ ($6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. The colitis model was induced in mice by feeding 3% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days. The mice received BZYQ (12 and $6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) by gavage on the 8th day after modeling, once per day, and sacrificed on the 2nd and 4th weeks, correspondingly. The colon length and weight of mice in each group were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used for pathological observation and colonic mucosal inflammation was scored. The mRNA and protein expression of NOD-like receptor thermoprotein domain 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), and cysteinyl aspartate-specific protease-1 (Caspase-1) was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)- 1β , IL-18, and IL-33 in colonic tissues. **Result:** Compared with the 2 weeks blank group, the 2 weeks model group showed shortened colon length, increased colon weight ($P<0.05$), loss of epithelial cells, destruction of gland structure, infiltration of a large number of inflammatory cells in mucosa and submucosa, local crypt abscess, and increase in mucosal inflammation score ($P<0.01$) as revealed by light microscopy, elevated levels of IL- 1β , IL-18, and IL-33 in colonic tissues ($P<0.05$), and increased mRNA and protein expression of NLRP3, ASC, and Caspase-1 ($P<0.05$). The intervention of BZYQ ($12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) restored colon length, alleviated mucosal injury ($P<0.05$), down-regulated the content of IL-18 ($P<0.05$), reduced the mRNA expression of NLRP3 and ASC as well as the protein expression of ASC and Caspase-1 compared with the conditions in the 2 weeks model group. Compared with the 4 weeks blank group, the 4 weeks model group showed decreased colon length, increased colon weight ($P<0.05$), decreased glands in the mucosal layer, expansion of glandular cavity, atrophy of crypt, local connective tissue hyperplasia and lymphocyte infiltration, increased inflammation score ($P<0.01$) as revealed by the light microscopy, increased expression of IL- 1β , IL-18, and IL-33 ($P<0.05$), and elevated mRNA and expression of NLRP3 inflammasome complex ($P<0.05$). Compared with the conditions in the 4 weeks model group, the intervention of BZYQ (12 and $6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) could improve colon length and weight ($P<0.05$), and the intervention of BZYQ ($12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) could also improve the inflammation score of the colon ($P<0.05$). Different from the acute stage, the intervention of BZYQ (12 and $6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) increased the content of IL-33 in the intestinal mucosa and up-regulated the mRNA and protein expression of NLRP3 inflammasome complexes ASC and Caspase-1 ($P<0.05$). **Conclusion:** BZYQ can relieve the injury of colitis induced by DSS in mice. The mechanism is related to the regulation of intestinal immune response mediated by NLRP3 inflammasome, and it has different regulatory effects in acute and chronic inflammation stages.

[Keywords] Buzhong Yiqiwan; colitis model; NOD-like receptor thermoprotein domain 3 (NLRP3) inflammasome; proinflammatory; anti-inflammation

溃疡性结肠炎(UC)是消化系统难治病之一,其导致的结直肠癌的发病率和死亡率极高,严重威胁人们的生命健康。西医治疗UC主要是针对肠道活

动期炎症,包括5-氨基水杨酸、生物制剂和小分子药物,以抑制炎症反应为主,但存在短效或较多不良反应的缺点^[1-4]。中医防治UC的临床实践表明,

中药复方在控制肠道炎症、减少并发症和疾病复发、改善患者生活质量及预后等方面具有综合效应,其中益气健脾法是针对UC迁延不愈、反复发作的根本治法,在改善UC患者症状,提高黏膜愈合质量等方面具有独特的优势^[5-7]。代表复方有参苓白术散、补中益气丸等^[8-9],其作用机制值得进一步探讨。NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)炎性体主要由NLRP3、接头蛋白指向相关斑点蛋白(ASC)和胱天蛋白酶-1(Caspase-1)组成。其在维持肠道内环境稳态中发挥了重要作用。研究表明NLRP3炎性体与炎症性肠病(IBD)尤其是UC的发生和发展密切相关,在炎症反应及肠道免疫屏障功能中举足轻重^[10-14]。本课题组前期研究表明,补中益气丸可能通过抑制结肠黏膜ASC、Caspase-1的表达,阻断NLRP3炎性体装配,从而对右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠UC有一定预防作用,增强结肠黏膜的抗损伤能力^[15]。中药复方是通过综合调节达到促使机体“恢复平衡”的效应,体现出多靶点、双向调节等优势^[16],这与NLRP3炎性体在肠道免疫“稳态”中的调节功能不谋而合。因此,本研究基于NLRP3炎性体通路进一步探究益气健脾的经典复方补中益气丸对UC小鼠模型急、慢性炎症不同阶段的干预作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6小鼠64只,体质量20~22 g,雌雄各半,动物合格证号SCXK(粤)2018-0034,购于广东省实验动物中心,于广州中医药大学SPF级动物中心饲养并进行相关实验。实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准(第2016060号)。

1.2 试剂 中成药补中益气丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号Z11020244,水丸,成人剂量为每日3次,6 g/次);DSS(美国MP Biomedicals公司,批号160110);全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量检测试剂盒(江苏凯基生物公司,批号分别为KGP250、KGP902);逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂(日本TaKaRa公司,批号分别为RR036A、RR820A);NLRP3抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号#15101)、ASC、Caspase-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab175449、ab108362、ab181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(中国康为世纪生物科技股份有限公司,批号

CW0103S);白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18和IL-33酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL18442、JL20253、JL20264);苏木素-伊红(HE)染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1005)。

1.3 仪器 Mini-protean TETra型垂直电泳仪、2211BR型Trans-Blot[®]SD Cell转印系统、ChemiDocTMXRS+成像仪、Imark酶标仪、CFX96型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司);NANODROP2000型超微量核酸蛋白检测仪(美国Thermo Scientific公司);D-8721型梯度PCR仪(日本TaKaRa公司)。

2 方法

2.1 造模及给药 将64只SPF级C57BL/6小鼠随机分为2周和4周正常组、模型组、补中益气丸高剂量组(12 g·kg⁻¹)和补中益气丸低剂量组(6 g·kg⁻¹),每组8只。除正常组外其余小鼠采用3% DSS(蒸馏水配制,每天更换,现用现配)自由饮水,连续7 d,7 d后正常喂养3周。治疗组于第8天开始分别灌胃补中益气丸混悬液(12、6 g·kg⁻¹)每天1次,连续3周,正常组和模型组给予同体积的蒸馏水灌胃。

2.2 样本采集及处理 分别于第2周末和第4周末处死小鼠,剪取结肠,沿纵向中轴切开,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗数次。测量、记录各组小鼠结肠长度和质量,取结肠中段约1 cm²大小的组织固定于10%甲醛溶液中,其余组织于-80℃中冻存备用。

2.3 HE染色法观察结肠组织病理学变化 石蜡包埋并切片,HE染色后镜下观察其形态。结肠组织病理评估采用炎症评分^[17-18]:0分,无炎症;1分,仅在黏膜肌层上方可见炎性细胞增多;2分,黏膜下层及以上炎性细胞增多;3分,累及肌层的炎性细胞增多;4分,累及浆膜的炎性细胞增多。

2.4 ELISA检测炎性细胞因子IL-1 β 、IL-18和IL-33含量 按照说明书以1:9体积比向结肠组织加入混有蛋白酶抑制剂的PBS进行充分匀浆,5 000×g离心10 min(离心半径8.4 cm)后取上清液进行ELISA实验。通过酶标仪在450 nm波长下测量各样本吸光度 A 并进行相应计算。

2.5 Real-time PCR检测NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA表达 根据试剂说明书,使用RNAiso从结肠组织中提取总RNA,在260 nm处测量 A 确定RNA样品的浓度。使用cDNA合成试剂盒将上述提取的总RNA逆转录为cDNA。选用SYBR预混

料 Ex-Taq II 试剂以及 Bio-Rad PTC-220 实时 PCR 系统进行 Real-time PCR, 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环; PCR 反应 95 °C 变性 5 s; 60 °C 退火和延伸 30 s, 40 个循环; 溶解曲线分析 95 °C, 10 s; 65 °C, 60 s, 1 个循环) 所有样本均设置 2 个复孔, 以 GAPDH 为内参进行基于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法的数据分析。PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
NLRP3	上游 CCAGACACTCATGTTGCTGTTTC	23
	下游 GAGGCTCCGGTTGGTGCTTA	20
ASC	上游 CAGTTCGTGCAGAGACCACCA	21
	下游 CTGCTCCAGGTCCATCACCA	20
Caspase-1	上游 ACTCGTACACGTCTTGCCCTCA	22
	下游 CTGGGCAGGCAGCAAATTC	19
GAPDH	上游 AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	23
	下游 CAACAATCTCCACTTTGCCACTG	23

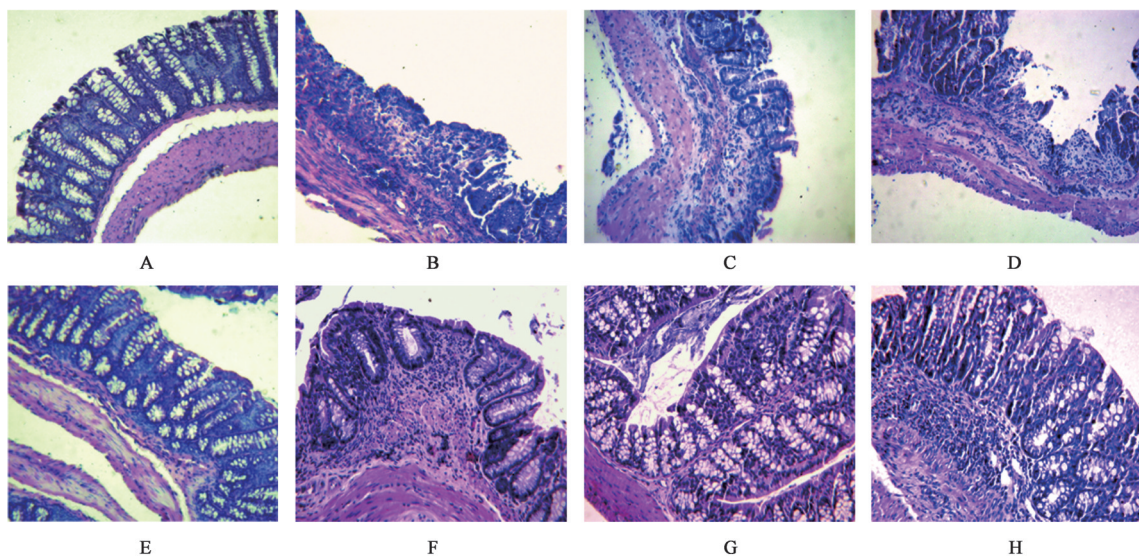
2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达 剪取适量结肠组织置于 RIPA 裂解缓冲液中充分裂解提取总蛋白, 通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳、PVDF 转膜后, 5% 胎牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 于 NLRP3(1:1 000)、ASC(1:2 000)、Caspase-1(1:2 000) 一抗中 4 °C 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000) 室温孵育

1 h。ChemiDoc TMXRS+ 成像仪观察蛋白条带。以 GAPDH(1:5 000) 为内参, Image Lab 软件分析定量表达数据。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析和 Dunnett 检验对数据进行统计评估, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对不同炎症阶段小鼠结肠长度、质量及病理评分的影响 模型小鼠从第 5 天起出现血便、扎堆、体质量下降等症状, 2 周后症状逐渐缓解, 4 周末正常组与 DSS 模型组小鼠体质量、体征无明显差异。与正常组比较, 模型组小鼠在 2 周和 4 周末结束时, 结肠长度均明显缩短, 质量明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 2 周和 4 周末补中益气丸高、低剂量组结肠长度明显增加 ($P < 0.05$), 结肠质量明显减轻 ($P < 0.05$)。病理观察发现, 2 周模型小鼠结肠上皮细胞缺失甚至黏膜层缺失, 黏膜层腺体紊乱, 局部可见隐窝脓肿, 黏膜下血管扩张, 黏膜及黏膜下层大量炎性细胞浸润, 有的炎症蔓延至肌层甚至浆膜层; 而 4 周模型小鼠结肠病理特征为较局限的隐窝破坏、变形、排列紊乱, 局部出现结缔组织增生, 部分淋巴细胞浸润。根据评分标准, 与正常组比较, 2 周及 4 周模型小鼠结肠的炎症评分均显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补中益气丸高剂量组明显降低 2 周和 4 周模型小鼠的炎症损伤评分 ($P < 0.05$)。见图 1、表 2。



注: A. 2 周正常组; B. 2 周模型组; C. 2 周补中益气丸高剂量组; D. 2 周补中益气丸低剂量组; E. 4 周正常组; F. 4 周模型组; G. 4 周补中益气丸高剂量组; H. 4 周补中益气丸低剂量组

图 1 补中益气丸对不同阶段各组小鼠结肠损伤的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Buzhong Yiqiwan on colonic injury in mice at different stages (HE, ×100)

表2 补中益气丸对各组小鼠结肠长度、质量及病理评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Buzhong Yiqiwan on colon length, quality and pathological score of mice in each groups ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	2周			4周		
		结肠长度 /cm	结肠质量 /g·cm ⁻¹	炎症评分 /分	结肠长度 /cm	结肠质量 /g·cm ⁻¹	炎症评分 /分
空白组		6.510±0.454	0.027±0.004	0.337±0.486	7.120±0.394	0.028±0.002	0.314±0.527
模型组		5.896±0.566 ¹⁾	0.046±0.006 ¹⁾	2.981±0.572 ²⁾	5.922±0.672 ¹⁾	0.042±0.003 ¹⁾	1.582±0.792 ²⁾
补中益气丸高剂量组	12	6.751±0.812 ³⁾	0.041±0.004	2.150±0.766 ³⁾	7.114±0.651 ³⁾	0.034±0.002 ³⁾	0.759±0.786 ³⁾
补中益气丸低剂量组	6	5.839±0.443	0.043±0.005	2.677±0.669	6.961±0.686 ³⁾	0.035±0.003 ³⁾	1.222±0.788

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05

3.2 对不同炎症阶段小鼠结肠中IL-1 β 、IL-18、IL-33含量的影响 与正常组比较,DSS模型小鼠结肠组织中IL-1 β 、IL-18、IL-33水平在2周末和4周末均明显升高(P<0.05);与模型组比较,补中益气丸高、

低剂量组可明显抑制2周末结肠中IL-18水平(P<0.05),上调4周末结肠组织IL-33水平(P<0.05),IL-1 β 表达水平差异无统计学意义。补中益气丸高、低剂量组组间比较差异无显著统计学意义。见表3。

表3 补中益气丸对各组小鼠结肠组织中IL-1 β 、IL-18、IL-33含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Buzhong Yiqiwan on contents of IL-1 β , IL-18 and IL-33 in colon tissue of mice in each groups ($\bar{x}\pm s, n=8$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	2周			4周		
		IL-1 β	IL-18	IL-33	IL-1 β	IL-18	IL-33
空白组		38.23±15.94	9.75±0.71	26.40±1.20	51.36±5.55	24.39±2.19	26.50±4.30
模型组		95.01±5.78 ¹⁾	47.35±6.13 ¹⁾	59.81±7.94 ¹⁾	103.34±8.40 ¹⁾	46.80±5.59 ¹⁾	62.72±2.40 ¹⁾
补中益气丸高剂量组	12	85.41±4.28	38.07±1.74 ²⁾	59.08±4.55	108.14±4.32	55.95±9.06	77.47±1.93 ²⁾
补中益气丸低剂量组	6	101.82±8.44	31.02±7.68 ²⁾	61.69±2.14	109.55±3.66	52.59±6.16	85.88±5.30 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05(表4和表5同)

3.3 对不同炎症阶段小鼠结肠中NLRP3、ASC、Caspase-1的mRNA表达的影响 与2周正常组比较,模型组小鼠结肠组织中NLRP3炎性小体复合物(NLRP3、ASC、Caspase-1)mRNA水平均明显升高(P<0.05);与2周模型组比较,2周补中益气丸高剂量组明显抑制NLRP3和ASC的mRNA水平(P<

0.05);与4周正常组比较,模型组NLRP3炎性小体复合物mRNA表达水平明显增高(P<0.05);与4周模型组比较,补中益气丸各剂量组可明显上调ASC和Caspase-1的mRNA水平,差异有统计学意义(P<0.05),补中益气丸高、低剂量组间比较差异无统计学意义。见表4。

表4 补中益气丸对各组小鼠结肠组织NLRP3、ASC、Caspase-1的mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

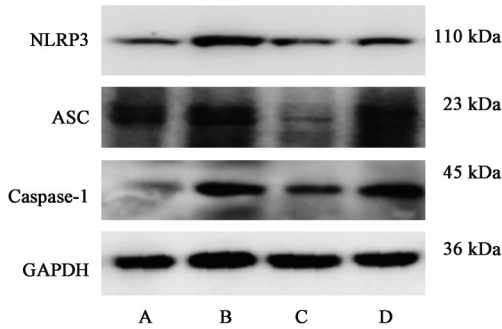
Table 4 Effect of Buzhong Yiqiwan on mRNA expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in colon tissue of mice in each groups ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	2周			4周		
		NLRP3	ASC	Caspase-1	NLRP3	ASC	Caspase-1
空白组		0.278±0.073	0.333±0.062	0.371±0.055	0.300±0.111	0.261±0.089	0.219±0.077
模型组		1.058±0.262 ¹⁾	1.067±0.089 ¹⁾	1.323±0.094 ¹⁾	1.016±0.163 ¹⁾	1.016±0.275 ¹⁾	1.136±0.113 ¹⁾
补中益气丸高剂量组	12	0.734±0.085 ²⁾	0.668±0.147 ²⁾	1.232±0.243	1.804±0.875	7.024±0.674 ²⁾	3.552±0.649 ²⁾
补中益气丸低剂量组	6	1.230±0.159	1.204±0.210	1.522±0.309	1.839±1.147	5.954±0.633 ²⁾	2.513±0.360 ²⁾

3.4 对不同炎症阶段小鼠结肠中NLRP3、ASC、Caspase-1的蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中NLRP3、ASC和Caspase-1的蛋白表达水平在第2周末和第4周末均明显增加(P<0.05);与模型组比较,2周补中益气丸高剂量组ASC和Caspase-1蛋白表达水平下调,4周补中益气丸高

剂量组ASC和Caspase-1蛋白的表达水平明显上调(P<0.05);2周补中益气丸低剂量组对NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达无明显作用,4周补中益气丸低剂量组ASC和Caspase-1的蛋白表达水平明显提高(P<0.05)。在慢性期(4周末),补中益气丸高剂量组、低剂量组治疗作用比较,差异无统计学意义。

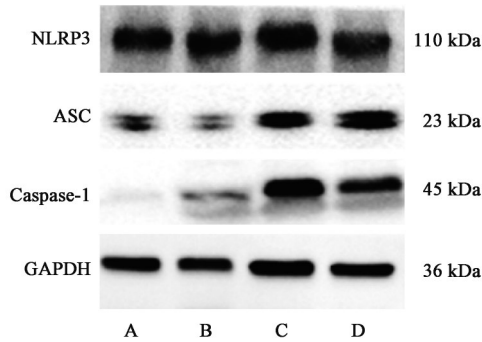
义。见图2和图3、表5。



注: A. 2周正常组; B. 2周模型组; C. 2周补中益气丸高剂量组; D. 2周补中益气丸低剂量组

图2 2周各組小鼠结肠组织 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in colon tissue of 2 week mice



注: A. 4周正常组; B. 4周模型组; C. 4周补中益气丸高剂量组; D. 4周补中益气丸低剂量组

图3 4周各組小鼠结肠组织 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of on protein expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in colon tissue of 4 week mice

4 讨论

UC是结肠反复发作的非特异性炎症,活动期以腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重为主要临床表现。该病为临床难治性疾病,病因病机复杂不清,本研究基于中药复方治疗UC的“缓解症状,促进黏膜修复及降低复发”等优势特征,尤其对益气健脾

法促进黏膜修复、调节肠道免疫微环境等方面进行研究,因此选择补中益气汤这个经典益气健脾复方。补中益气丸是补中益气汤方的丸制剂,主要由黄芪、白术、当归、党参、陈皮、柴胡、升麻和炙甘草等8味中药组成。方中黄芪味甘微温,入脾肺经,补中益气,升阳固表,为君药;党参、白术和炙甘草补气健脾,为臣药;当归养血和营,协党参、黄芪补气养血,陈皮理气和胃,使诸药补而不滞,升麻、柴胡升阳举陷,协助黄芪以升提下陷之中气,炙甘草调和诸药,共为佐药。2009年中华中医药学会脾胃病分会制定的“溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见”^[19]将本病归属中医“痢疾”“久痢”和“肠澼”等范畴。2017年“溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见”^[20]认为“久痢”更能准确地描述本病,因为本病患者因其所处缓解期或发作期而具有不同的临床表现,且本病具有病程长、易复发的特点。该意见指出,UC的发病基础是素体脾气虚弱,病理性质是本虚标实。另外,《黄帝内经》有云:“邪之所凑,其气必虚”,《治病法轨》也反复强调“欲泄其邪,先补其虚”^[21],李日光^[8]使用补中益气丸治疗溃疡性结肠炎80例,认为其确有疗效;北京中医药学会脾胃病专业委员会发表的《参苓白术散和补中益气方临床应用专家共识意见》^[22]认为UC患者活动期(脾胃虚弱证)可使用基础治疗联合补中益气方。然而目前对于补中益气方治疗UC的相关研究甚少,有待进一步探索。本研究设计观察UC小鼠模型活动期及其与缓解期交替的整个动态变化过程,在此基础上探讨益气健脾复方对黏膜损伤修复及肠道免疫重要靶标NLRP3炎性复合体变化的影响,有利于阐释健脾法在防治UC中的作用机制。

DSS诱导UC动物模型始于1985年,其病理特征与人类UC相近,是目前最为适宜的造模方法。DSS诱导的急性期UC模型小鼠一般在DSS干预3~5d后出现体质量明显下降,腹泻和便血加重,并随着干预时间的延长而逐渐加重。组织改变肉眼可

表5 补中益气丸对各组小鼠结肠组织 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Buzhong Yiqiwan on protein expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in colon tissue of mice in each groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	2周			4周		
		NLRP3 /GAPDH	ASC /GAPDH	Caspase-1 /GAPDH	NLRP3 /GAPDH	ASC /GAPDH	Caspase-1 /GAPDH
空白组		0.322±0.089	0.228±0.159	0.400±0.098	0.251±0.080	0.639±0.153	0.724±0.061
模型组		0.665±0.164 ¹⁾	0.586±0.237 ¹⁾	1.225±0.188 ¹⁾	0.569±0.177 ¹⁾	0.992±0.201 ¹⁾	0.945±0.047 ¹⁾
补中益气丸高剂量组	12	0.417±0.086	0.394±0.052 ²⁾	0.583±0.069 ²⁾	0.496±0.121	1.175±0.055 ²⁾	1.113±0.105 ²⁾
补中益气丸低剂量组	6	0.594±0.047	0.403±0.182	1.012±0.254	0.685±0.142	1.198±0.024 ²⁾	1.109±0.099 ²⁾

见结肠充血水肿、多灶性小溃疡、结肠缩短,病理学表现为结肠上皮黏膜糜烂、损伤严重,腺体隐窝结构破坏,淋巴细胞及伴大量中性粒细胞等浸润,杯状细胞丢失,病变多累及黏膜层,也可侵犯及黏膜下层和黏膜肌层。另一方面,DSS干预1周后正常喂养至第4周,小鼠可呈现UC缓解期模型^[23]。DSS诱导的慢性期UC模型主要病理变化表现为光镜下可见较局限的隐窝破坏伴上皮再生修复及腺体增生,以隐窝变形、排列紊乱等病变为突出特征^[24-26]。在本研究中,2周模型小鼠结肠上皮细胞缺失甚至黏膜层缺失,黏膜层腺体紊乱,局部可见隐窝脓肿,黏膜下血管扩张,黏膜及黏膜下层大量炎性细胞浸润,有的炎症蔓延至肌层甚至浆膜层,符合急性期模型的病理表现;而4周模型小鼠结肠病理特征为较局限的隐窝破坏、变形、排列紊乱,局部出现结缔组织增生,部分淋巴细胞浸润,符合慢性期模型的病理表现。无论是在结肠炎小鼠急性期还是慢性修复期,补中益气丸干预均可改善模型小鼠结肠损伤:增加结肠长度,减轻结肠质量,降低黏膜炎症评分。提示补中益气丸对结肠炎的治疗作用贯穿于急、慢性病理阶段。

本实验发现模型小鼠结肠组织中NLRP3、ASC、Caspase-1的mRNA和蛋白表达水平均显著升高,与覃景春等^[27]在2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠急性结肠炎模型上检测的结果相似。然而值得注意的是,补中益气丸在不同阶段对NLRP3炎症小体的调控则表现出了相反的趋势。在急性期,补中益气丸干预可以下调NLRP3、ASC的mRNA表达水平及ASC、Caspase-1的蛋白表达水平;在慢性期,补中益气丸干预后ASC、Caspase-1的mRNA和蛋白表达水平呈现上调的趋势。这不仅提示NLRP3炎性体的激活在结肠炎症不同病理阶段中可能存在不同的功能表型,也部分反应了中药复方的多靶点及其双向调节作用。

目前研究人员对NLRP3炎症小体在结肠炎发展中的作用研究仍存在争议。有研究发现从IBD患者分离出的大肠埃希菌菌株可以通过NLRP3炎症小体诱导小鼠巨噬细胞的IL-1 β 分泌^[28];使用NLRP3依赖的前体(pro)-Caspase-1、IL-1 β 和IL-18的抑制剂Fc11a-2可减轻急性结肠炎小鼠的症状^[29];与野生型小鼠对比,NLRP3^{-/-}小鼠在DSS造模后,急性结肠炎的严重程度明显下降^[30]。这些研究表明NLRP3炎性体对结肠炎尤其是急性结肠炎的发生发展具有促进作用。与之相反,部分研究认为

NLRP3在维持肠道内稳态中起着关键作用,可以保持肠道上皮屏障完整性并降低结肠炎模型动物在实验期间的死亡率,还可以影响肠道内生物群的组成^[31-34]。譬如NLRP3^{-/-}、ASC^{-/-}和Caspase-1^{-/-}小鼠对DSS和TNBS诱导的结肠炎更具有易感性,表现为小鼠肠道上皮细胞增殖缺陷,上皮屏障功能减弱,细菌的透过率升高^[31-32,35];NLRP3炎症小体可以通过调节IL-18、IL-1 β 等缓解肠道损伤反应,维持肠道稳态^[36-37]。由此可见,NLRP3炎症小体在结肠炎中发挥的作用是复杂而多样的,就本研究的实验结果而言,在急性炎症阶段,NLRP3炎性体激活可能是加重炎症反应、破坏黏膜形态的有害因素,而在慢性缓解阶段,炎性体通路可能又展现出维持肠道免疫、促进黏膜愈合的保护作用。补中益气丸在炎症急性期通过抑制NLRP3炎症小体的表达水平可以减轻炎症反应,而在慢性期则激活NLRP3炎症小体的表达来促进结肠黏膜稳态的修复。

IL-1 β 、IL-18是NLRP3炎症小体分泌的下游炎性细胞因子。细胞外活性氧(ROS)、mtDNA、ATP刺激或细胞内(如线粒体损伤)产生的ROS、活性氮均可引起NLRP3与凋亡相关斑点样蛋白形成复合物,进一步募集前Caspase-1激活NLRP3炎症小体,释放活化的IL-1 β 和IL-18引发炎症反应^[38]。IL-33作为白细胞介素-1家族的成员,是由受损或坏死的屏障细胞(内皮细胞和上皮细胞)释放的内源性细胞因子,在炎症性疾病、变态反应性疾病、代谢性疾病、肿瘤等疾病进程中发挥广泛作用。近年来发现在UC患者肠黏膜和血清中IL-33异常表达,在IBD尤其是UC中具有促炎和抑炎的双重作用,既能加重炎症反应,加快疾病的进展,也能减轻炎症反应,促进黏膜愈合^[39-41]。大量研究发现IL-33参与UC中的炎症反应,并与其轻重程度呈正相关^[41-42],也有不少研究表明IL-33参与抑制UC的炎症反应,修复破损黏膜:DUAN等^[43]发现给予人重组IL-33治疗TNBS诱导的结肠炎可通过调控辅助性T细胞2/叉头状螺旋转录因子3调节性T细胞(Th2/Foxp3+Treg)信号减轻炎症和改善症状;GROBETA等^[44]认为IL-33可以抑制DSS诱导的慢性结肠炎中的炎症反应,减少肠道痉挛;SPONHEIM等^[45]发现UC溃疡病损处可见大量表达IL-33的血小板衍生生长因子受体 β 肌成纤维细胞标记物 α -平滑肌肌动蛋白⁺(PDGFR β ⁺ α -SMA⁺)肌纤维母细胞,认为IL-33参与修复UC溃疡处的黏膜;张亦婷^[46]研究发现IL-33可以通过促进神经营养因子GDNF及其受体RET的

表达,下调通透性调节蛋白MLCK的表达,促进紧密连接相关蛋白生成,改善肠上皮屏障通透性,从而参与UC小鼠肠上皮屏障的损伤修复和功能重塑。以上研究表明IL-33在UC中的作用具有多效性。本研究发现无论是处于急性期抑或是慢性期,DSS模型小鼠结肠组织中IL-1 β 、IL-18、IL-33水平均明显升高,补中益气丸在结肠炎急性期可以有效抑制IL-18的表达水平从而减轻炎症损伤,在慢性期则能显著上调IL-33的表达水平改善黏膜形态,提示补中益气丸在结肠炎不同病理阶段的作用机制有所不同。

另外,在本研究中,补中益气丸高剂量在结肠炎急性期和慢性期均能发挥治疗作用,有效改善结肠组织损伤、NLRP3炎症小体、IL-18及IL-33的表达水平;而补中益气丸低剂量在结肠炎慢性期起到一定程度的治疗作用:改善结肠长度和质量,调节NLRP3炎症小体、IL-18及IL-33的表达水平,与补中益气丸高剂量组在结肠炎慢性期的治疗作用无显著差异,提示伴随炎症的缓解,药物的干预剂量可适当降低。

综上所述,本研究在一定程度上为补中益气丸缓解临床结肠炎患者症状提供了科学依据,并从NLRP3炎症体通路分析补中益气丸在不同病理阶段的干预机制有所不同,显示了中药复方多靶点多效应的疗效优势,但其作用机制还有待进一步的探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 吴开春. 重视炎症性肠病诊断和治疗的难点和热点问题[J]. 中国医学前沿杂志:电子版, 2021, 13(7):1.
- [2] 林俊超,梁洁,吴开春. 生物制剂与小分子药物在炎症性肠病治疗中的进展[J]. 中国医学前沿杂志:电子版, 2021, 13(7):6-13.
- [3] 陈旻湖,毛仁. 中国炎症性肠病研究40年(1980-2020)[J]. 中华消化杂志, 2021, 41(9):577-581.
- [4] 吴闯,韩昌鹏,汪庆明,等. 炎症性肠病与线粒体自噬的相关研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(11):2113-2118.
- [5] 萧慧莹,杜铭君. 溃疡性结肠炎的中医药临床研究进展[J]. 大众科技, 2020, 22(9):84-87.
- [6] 刘琼,成哲,陈广. 溃疡性结肠炎中医治疗进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(7):1191-1194.
- [7] 赵颖,张小琴. 中医药修复肠黏膜屏障治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国中医急症, 2021, 30(5):

936-940.

- [8] 李日光. 补中益气丸治疗溃疡性结肠炎80例临床观察[J]. 中国实用医药, 2012, 7(7):172-173.
- [9] 朱志义. 补中益气汤内科杂病证治举隅[J]. 河北中医, 2002, 8:595-596.
- [10] ZHEN Y, ZHANG H. NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2019, 10:276.
- [11] 史济华,许乐. NLRP3炎症小体与溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(7):989-992.
- [12] 杨连雷,陈梦娜,李善高,等. NOD样受体蛋白3炎症小体表达水平与溃疡性结肠炎病变活动的关系[J]. 中华消化杂志, 2019(4):229-236.
- [13] SHAO B Z, WANG S L, PAN P, et al. Targeting NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel disease: Putting out the fire of inflammation[J]. Inflammation, 2019, 42(4):1147-1159.
- [14] KANNEGANTI T D. Inflammatory bowel disease and the NLRP3 inflammasome [J]. N Engl J Med, 2017, 377(7):694-696.
- [15] 罗书,李燕舞,巫燕莉,等. 补中益气丸对溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜mRNA表达的影响[J]. 中成药, 2016, 38(3):485-489.
- [16] 王小强,李双阳,白雪,等. 中药双向调节作用的临床与研究进展[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6):215-221.
- [17] 李敏,刘肖,徐小波,等. 甘草泻心汤联合血竭对DSS诱导的UC模型大鼠的抗炎作用[J]. 陕西中医药大学学报, 2022, 45(1):77-83.
- [18] 许话,严红梅,陈斓. 仙茅苷对溃疡性结肠炎大鼠JAK/STAT/NF- κ B信号通路的影响[J]. 中国药师, 2022, 25(3):406-413.
- [19] 张声生,李乾构,沈洪,等. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识(2009)[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5):527-532.
- [20] 张声生,沈洪,郑凯,等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8):3585-3589.
- [21] 王明华. 王雨三《治病法轨》学术思想探颐[J]. 江苏中医药, 2020, 52(11):9-10.
- [22] 张声生,周强. 参苓白术散和补中益气方临床应用专家共识意见[J]. 北京中医药, 2018, 37(7):590-597.
- [23] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice[J]. Curr Protoc Immunol, 2014, 104:15-25.
- [24] 刘雷蕾,施丽婕. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎动物模型研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(1):207-210.

- [25] COOPER H S, MURTHY S N, SHAH R S, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2):238-249.
- [26] 胡仁伟, 欧阳钦, 陈代云. 右旋葡聚糖硫酸钠小鼠溃疡性结肠炎动物模型建立方法探讨[J]. *胃肠病学*, 2002, 6:331-334.
- [27] 覃景春, 钱彩云, 揭凤鸣, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠肠道NLRP3炎性体的调控研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(4):90-94.
- [28] DE LA FUENTE M, FRANCHI L, ARAYA D, et al. *Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome [J]. *Int J Med Microbiol*, 2014, 304(3/4):384-392.
- [29] LIU W, GUO W, WU J, et al. A novel benzo [d] imidazole derivate prevents the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(10):1504-1512.
- [30] BAUER C, DUEWELL P, MAYER C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome [J]. *Gut*, 2010, 59(9):1192-1199.
- [31] ZAKI M H, BOYD K L, VOGEL P, et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis [J]. *Immunity*, 2010, 32(3):379-391.
- [32] HIROTA S A, NG J, LUENG A, et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(6):1359-1372.
- [33] DUPAUL-CHICOINE J, YERETSSIAN G, DOIRON K, et al. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases [J]. *Immunity*, 2010, 32(3):367-378.
- [34] BAUER C, DUEWELL P, LEHR H A, et al. Protective and aggravating effects of NLRP3 inflammasome activation in IBD models: Influence of genetic and environmental factors [J]. *Dig Dis*, 2012, 30(Suppl 1):82-90.
- [35] ALLEN I C, TEKIPPE E M, WOODFORD R M, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(5):1045-1056.
- [36] ITANI S, WATANABE T, NADATANI Y, et al. NLRP3 inflammasome has a protective effect against oxazolone-induced colitis: A possible role in ulcerative colitis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:39075.
- [37] LIU J J, DAVIS E M, WINE E, et al. Epithelial cell extrusion leads to breaches in the intestinal epithelium [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(5):912-921.
- [38] LOPEZ-ARMADA M J, RIVEIRO-NAVEIRA R R, VAAMONDE-GARCIA C, et al. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response [J]. *Mitochondrion*, 2013, 13(2):106-118.
- [39] 胡蝶, 浦春. 可溶性ST2及其配体IL-33与疾病关系的研究进展 [J]. *临床输血与检验*, 2021, 23(1):131-134.
- [40] 李源, 蒋敬庭, 卢斌峰. IL-33/ST2信号与Treg在免疫性疾病中的研究进展 [J]. *临床检验杂志*, 2021, 39(2):128-131.
- [41] 唐栓, 王小云, 龚镭, 等. IL-33在溃疡性结肠炎中作用的研究进展 [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2015, 9(19):3612-3615.
- [42] 李春明, 徐晓霞, 徐爱香, 等. 炎症性肠病与IL-33的相关性研究 [J]. *黑龙江医药科学*, 2020, 43(4):38-39.
- [43] DUAN L, CHEN J, ZHANG H, et al. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T-cell responses in mice [J]. *Mol Med*, 2012, 18:753-761.
- [44] GROBETA P, DOSER K, FALK W, et al. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(10):1900-1909.
- [45] SPONHEIM J, POLLHEIMER J, OLSEN T, et al. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(6):2804-2815.
- [46] 张亦婷. IL-33调节肠道神经营养因子表达改善肠道炎症损伤的作用研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2021.

[责任编辑 孙丛丛]