

# 芍药汤经 HMGB<sub>1</sub> 调节湿热型溃疡性结肠炎大鼠 MyD88 和 NF- $\kappa$ B 的分子机制

王移飞, 王凤仪\*, 徐兰萍, 李丽霞, 蒲晓薇, 祖健, 赵党生  
(甘肃中医药大学, 兰州 713000)

**[摘要]** **目的:**观察芍药汤对湿热型溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠模型结肠组织中高迁移率族蛋白 B<sub>1</sub> (high mobility group protein B<sub>1</sub>, HMGB<sub>1</sub>)的调控,分析其对衔接蛋白髓样分化因子 88(MyD88)和核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的影响,探讨芍药汤对湿热型 UC 的作用机制。**方法:**Wistar 大鼠雌雄各 60 只,分为空白组、模型组、芍药汤高、中、低剂量组、柳氮磺吡啶组,以 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)结合乙醇复合法复制湿热型 UC 大鼠模型,芍药汤高、中、低剂量灌胃,柳氮磺吡啶组予柳氮磺吡啶研磨成粉配置成与中药等体积液体灌胃,空白组及模型组予等体积生理盐水灌胃,连续 21 d。取结肠组织,运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time, PCR)法、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 mRNA 及蛋白表达,苏伊红-木精(HE)染色观察病理切片。**结果:**与空白组比较,模型组 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B 蛋白及 mRNA 表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,芍药汤各组、柳氮磺吡啶组 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B 蛋白及 mRNA 表达均有不同程度地下降,芍药汤高剂量组及柳氮磺吡啶组最为显著( $P < 0.05$ )。**结论:**芍药汤可调控 HMGB<sub>1</sub> 抑制 TLRs 信号通路中 MyD88, NF- $\kappa$ B 基因表达,减弱湿热型 UC 的炎症反应。

**[关键词]** 芍药汤; 溃疡性结肠炎; 湿热型; 高迁移率族蛋白 B<sub>1</sub> (HMGB<sub>1</sub>); 衔接蛋白髓样分化因子 88 (MyD88); 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R24;R285.5;R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0086-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180942

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.2233.036.html>

**[网络出版时间]** 2018-02-23 1:12

## Effect of HMGB<sub>1</sub> on MyD88 and NF- $\kappa$ B in Syndrome Ulcerative Colitis Rats by Shaoyatong

WANG Yi-fei, WANG Feng-yi\*, XU Lan-ping, LI Li-xia, PU Xiao-wei, ZU Jian, ZHAO Dang-sheng  
(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 713000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Shaoyatong on the expression of high mobility group protein B<sub>1</sub> (HMGB<sub>1</sub>), adapter protein myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the colon tissues of rats with damp-heat type ulcerative colitis (UC), and explore the mechanism of Shaoyatong damp-heat UC intervention. **Method:** Sixty male and sixty female Wistar rats were divided into blank group, model group, Shaoyatong high, medium and low dose groups, and sulfasalazine group. The rat model of damp-heat type UC was established by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) combined with ethanol. High, medium and low doses of Shaoyatong were given by intragastric administration, and the sulfasalazine was ground into powder and configured to be filled with liquid of equal volume. The rats in the blank group and model group were given with normal saline for continuous 21 days. Then colonic tissues were harvested.

**[收稿日期]** 20171030(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(8150150228)

**[第一作者]** 王移飞,在读硕士,从事中医四诊理论研究与分析,E-mail:2553247625@qq.com

**[通信作者]** \*王凤仪,硕士生导师,教授,从事中医四诊理论研究与分析,E-mail:wfy@gszy.edu.cn

The content of gene was detected by Real-time PCR, and the content of protein was detected by Western blot. The pathological sections were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** As compared with the blank group, the protein and mRNA expressions of HMGB<sub>1</sub>, MyD88 and NF- $\kappa$ B were significantly increased in the model group ( $P < 0.05$ ). As compared with the model group, the expressions of HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B were decreased in Shaoyaotang groups and Sulfasalazine group ( $P < 0.05$ ). The effect was most significant in Shaoyaotang high dose group and sulfasalazine group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Shaoyaotang can regulate HMGB<sub>1</sub>, inhibit MyD88 and NF- $\kappa$ B in TLRs signaling pathway and reduce the inflammatory reaction of damp-heat type UC.

[ **Key words** ] Shaoyaotang; ulcerative colitis; damp-heat type; high mobility group protein B<sub>1</sub> (HMGB<sub>1</sub>); adapter protein myeloid differentiation factor 88 (MyD88); nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是指原因不明的直肠和结肠慢性非特异性炎症性疾病<sup>[1]</sup>,临床上主要见于腹痛、腹泻、直肠出血、体质量下降等症状,并且有反复发作的特点<sup>[2]</sup>。作为 IBD 的两种主要亚型之一的溃疡性结肠炎(UC),其病变主要局限于结肠黏膜,表现为炎症反应或溃疡,多累及直肠或远端结肠。高迁移率族蛋白 B<sub>1</sub>(high mobility group B<sub>1</sub>, HMGB<sub>1</sub>)是细胞核中一种典型的低分子非组蛋白,当参与炎症反应时,其机制主要是由多种形态的细胞分泌,包括活化的炎症细胞、受损及坏死的细胞,作为一种促炎细胞因子在细胞外与不同的受体结合,激活相关信号通路,介导下游信号转导,发挥炎症介质作用,参与多种炎症性疾病的发生、发展和转归<sup>[3-5]</sup>。而多项实验研究表明了 HMGB<sub>1</sub> 引导的 Toll 样受体(TLRs)信号通路参与并且调控了 UC 的发生。陆宗海等<sup>[6]</sup>发现 HMGB<sub>1</sub> 抗体能够抑制 UC 小鼠结肠黏膜 HMGB<sub>1</sub> 的表达,对结肠黏膜具有保护作用,葛文松等<sup>[7]</sup>研究表明 UC 小鼠结肠黏膜 HMGB<sub>1</sub> 的表达与 TLRs 所介导的信号通路分子如核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)成正相关,徐世军等<sup>[8]</sup>研究发现通过对 TLR2 和 TLR4 信号转导的激活,NF- $\kappa$ B 可引发肠道黏膜免疫反应的发生,从而进一步表明了 NF- $\kappa$ B 在 UC 的发病机制中的枢纽作用,徐世军等<sup>[9]</sup>研究认为髓样分化因子 88(MyD88)作为 TLRs 参与了 IBD 的发病过程。故对通过 HMGB<sub>1</sub> 调控 TLR 信号通路来抑制 UC 发病的进展具有重要意义。

中医认为 UC 主要发病机制为湿热之邪,治疗当以清热利湿法为主<sup>[10]</sup>,本研究选方《保命集》中的芍药汤,具有清热利湿,调气活血之功。本研究复建湿热型 UC 大鼠模型,通过芍药汤的干预,观察分析 HMGB<sub>1</sub> 介导的 TLR2/4 信号通路中衔接蛋白 MyD88 以及 NF- $\kappa$ B 的变化,从而从分子机制上来阐明芍药汤干预湿热型 UC 的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 Wistar 大鼠 120 只,雌雄皆有,体质量(200 ± 20)g,由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。正常饲养,每日观察其进食水、活动状态、大小便,确认健康大鼠以备实验使用。许可证号 SYXK(甘)2015-0005,所有动物及相关实验研究均符合甘肃中医药大学伦理委员会有关动物实验指导原则,伦理审查编号 2017-069。

**1.2 药物及试剂** 芍药汤药材由广州一方制药有限公司提供,由甘肃中医药大学附属医院药剂科制剂室加工组方配制为配方颗粒(批号 20170318),配方比例为白芍-当归-黄连-槟榔-木香-大黄-黄芩-肉桂-炙甘草 4:2:2:1:1:1:2:1:1;5% 的 TNBS,大鼠免疫球蛋白 G(IgG)抗原,完全弗式佐剂(美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBP0889V, 20170301, SLBP0432V);柳氮磺吡啶(上海信宜天平药业有限公司,批号 09161120);兔抗 HMGB<sub>1</sub> 抗体,兔抗 NF- $\kappa$ B 抗体(美国 Gene Tex 公司,批号分别为 40079, 42270);兔抗 MyD88 抗体,兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(美国 Abcom 公司,批号分别为 GR-193027-2, ab9485);trizol(美国 Ambion 公司,批号 113605);水合氯醛(中国天津市凯信化学工业有限公司,批号 20150328);无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,批号 20160410);猪油(中国江苏南顺食品有限公司,批号 K161209);红星二锅头(中国北京红星股份有限公司,批号 20170103)。

**1.3 仪器** DMIL-BFC295 型倒置显微镜,DFC295 型成像系统(日本奥林巴斯公司);applied biosystems 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Thermo Firsher Scientific 公司);S1000 型逆转录 PCR 仪,非标蛋白浓度仪,PowerPac 型转膜仪,Mri-PROTEAN 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组及复制湿热型 UC 大鼠模型<sup>[11]</sup>

**2.1.1 分组** 大鼠120只分为12组,雌雄各6组,每组各10只,为空白组、模型组、芍药汤高、中、低剂量组、柳氮磺吡啶组。

**2.1.2 湿热内蕴证大鼠模型的复制** 120只大鼠普通饲料饲养,其中模型组、芍药汤组及柳氮磺吡啶组共计100只大鼠根据大鼠体质量使用猪油和白酒进行隔日交替灌胃,共20 d;造模第6,20天在大鼠背部、腹股沟、足趾部多点注射配置好的抗原(由大鼠抗原和完全弗氏佐剂1:1配置,每只大鼠0.8 mg抗原)。空白组每日灌服等剂量生理盐水。

**2.1.3 UC 大鼠模型的复制** 在湿热内蕴证候模型成功后,模型组、芍药汤组及柳氮磺吡啶组大鼠在第21天禁食不禁水1 d,用10%水合氯醛 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉后,将直径2 mm,长15 cm的硅胶管由肛门轻柔插入6 cm处,按 $100\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 计算TNBS(约等于TNBS原液 $0.02\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + 50%乙醇0.25 mL缓慢注入距肛门约6 cm处的肠腔内,捏紧肛门,倒置8 min即可。

**2.2 给药** 在造模完成后第2天,芍药汤低、中、高剂量组按6,12,24  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 煎剂灌胃干预,柳氮磺吡啶组研磨成粉配置成与中药等体积液体,按 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃,空白组及模型组灌胃给予等体积生理盐水,连续21 d。

**2.3 大鼠疾病活动** 造模成功后每日观察模型大鼠活动状态、毛发稀疏程度及色泽、大便质地、肉眼血便情况,记录体质量变化。

**2.4 结肠组织取材及结肠组织病理标本制备** 各组动物于最后一次灌胃给药后禁食不禁水24 h,10%水合氯醛( $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )麻醉后,在低温条件下快速剖取肛门上8 cm结肠组织,用预冷生理盐水冲洗,滤纸吸干,纵向切开分为两部分,一部分无酶冻存管 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测,分别放置于4%的多聚甲醛密封避光 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于常规病理常规制片及苏木素-伊红(HE)染色。

**2.5 采用 Real-time PCR 检测结肠黏膜组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B mRNA 的表达** 运用 trizol 法对样品 RNA 进行抽提,紫外线洗手法测定 RNA 的质量和浓度。根据反转录试剂盒说明反转录,合成 cDNA。使用大连宝生物公司(Takara)设计引物序列,引物序列如下  $\beta$ -actin (127 bp): 上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'; HMGB<sub>1</sub> (127 bp):

上游 5'-ATGGGCAAAGGAGATCCTA-3', 下游 5'-ATTTCATCATCATCATCTTCT-3'; MYD88 (121 bp): 上游 5'-TATACCAACCCTTGCACCAAGTC-3', 下游 5'-TCAGGCTCCAAGTCAGCTCCTC-3'; NF- $\kappa$ B (134 bp): 上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'。按 Real-time PCR 试剂盒在进行 PCR 扩增,反应条件为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 1 min 后采集信号,重复 35 个循环。根据内参及各指标  $C_t$  值使用相对定量法  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法求得 mRNA 相对表达量。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B 蛋白的表达** 采用 RIPA 蛋白提取液提取蛋白质,用 BCA 法检测样品蛋白质浓度,  $2\times$  SDS 凝胶加样缓冲液与蛋白质  $100\text{ }\mu\text{g}$  相混合,所得混合液使用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,分离条件为层积胶 80 V, 30 min, 分离胶 120 V, 1 h; 用硝酸纤维素膜进行转膜,转膜条件为 120 V, 1.5 h, 结束后进行封闭 2 h; 加入一抗 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B (1:1 000), 进行一抗杂交; 一抗孵育完成洗膜后加入酶标二抗 IgG (1:5 000)  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h, 洗膜干燥后进行曝光、压片。

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计分析,运用单因素变量法进行方差分析,采用  $\bar{x} \pm s$  表示,以最小显著性差异法进行两两比较,双侧检验以  $P < 0.05$  为差别有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对湿热型 UC 大鼠结肠病理的影响** 空白组黏膜上皮完整,固有层腺体结构清晰,排列整齐,黏膜下层无充血、水肿及炎性细胞,无坏死,杯状细胞丰富;模型组黏膜表层至肌层均有不同程度的缺损,几乎无上皮覆盖,腺体结构不完整,各层有明显的炎性细胞浸润,并出现溃疡;与模型组比较,芍药汤各治疗组均有不同程度的新生腺体,但腺体排列紊乱无规则,可见少量的杯状细胞,仍可见少量的炎性细胞浸润及溃疡瘢痕,以高剂量组黏膜修复程度最为显著;柳氮磺吡啶组虽可见新生腺体,黏膜表层修复较好,但仍有大量炎性细胞浸润。见图 1。

**3.2 对湿热型 UC 大鼠结肠黏膜组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B mRNA 的表达的影响** 与空白组比较,模型组结肠组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B mRNA 均明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,柳氮磺吡啶组结肠组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B mRNA 表达量下降 ( $P < 0.05$ ),芍药汤各剂量组 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF- $\kappa$ B mRNA 均有不同程度地降

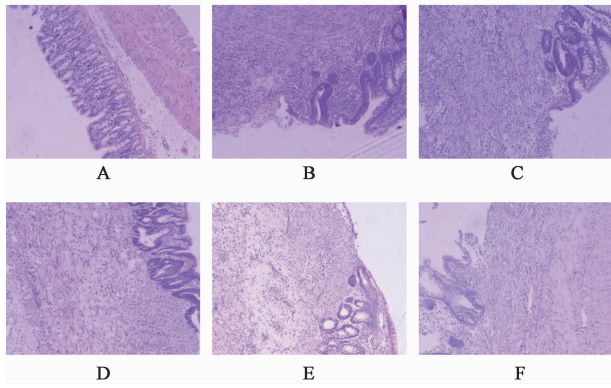


图 1 芍药汤对湿热型 UC 大鼠的结肠黏膜的影响 (HE, ×100)  
A. 空白组; B. 模型组; C. 芍药汤低剂量组 (6 g·kg<sup>-1</sup>); D. 芍药汤中剂量组 (12 g·kg<sup>-1</sup>); E. 芍药汤高剂量组 (24 g·kg<sup>-1</sup>); F. 柳氮磺吡啶组 (1 g·kg<sup>-1</sup>) (图 2 同)

Fig. 1 Effect of Shaoyaotang on colonic mucosa of syndrome ulcerative colitis rats (HE, ×100)

低,其中芍药汤高剂量组下降最为明显 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 芍药汤对湿热型 UC 大鼠结肠黏膜组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF-κB mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Shaoyaotang on colonic HMGB<sub>1</sub>, MyD88 and NF-κB mRNA of syndrome UC rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | HMGB <sub>1</sub>         | MyD88                     | NF-κB                     |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白    | -                     | 1.00 ± 0                  | 1.00 ± 0                  | 1.00 ± 0                  |
| 模型    | -                     | 3.67 ± 0.40 <sup>1)</sup> | 5.49 ± 0.29 <sup>1)</sup> | 8.57 ± 0.40 <sup>1)</sup> |
| 芍药汤   | 6                     | 1.27 ± 0.34               | 1.80 ± 0.53               | 0.67 ± 0.32 <sup>2)</sup> |
|       | 12                    | 0.78 ± 0.05 <sup>2)</sup> | 1.22 ± 0.22 <sup>2)</sup> | 0.47 ± 0.24 <sup>2)</sup> |
|       | 24                    | 0.36 ± 0.11 <sup>2)</sup> | 0.87 ± 0.55 <sup>2)</sup> | 0.11 ± 0.03 <sup>2)</sup> |
| 柳氮磺吡啶 | 1                     | 0.35 ± 0.10 <sup>2)</sup> | 1.20 ± 0.17 <sup>2)</sup> | 0.50 ± 0.02 <sup>2)</sup> |

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

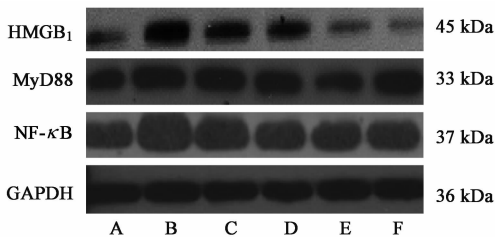


图 2 芍药汤对湿热型 UC 大鼠的结肠组织 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF-κB 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Shaoyaotang on colonic HMGB<sub>1</sub>, MyD88 and NF-κB of syndrome UC rats

灰黑便,无明显恶臭,无明显扎堆蜷卧现象,体质量也逐渐上升,其中以芍药汤高剂量组及柳氮磺吡啶组最为明显。

#### 4 讨论

UC 的发病机制主要与遗传、免疫、微生物和环境等因素相关,免疫因素占据了重要地位,其机制是

3.3 对湿热型 UC 大鼠结肠黏膜组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF-κB 蛋白的表达的影响 与空白组比较,模型组结肠组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF-κB 蛋白表达量均明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,柳氮磺吡啶组结肠组织中 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF-κB 蛋白表达量下降 ( $P < 0.05$ ),芍药汤各剂量组 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF-κB 均有不同程度的降低,其中芍药汤高剂量组下降最为明显 ( $P < 0.05$ )。见图 2,表 2。

3.4 对湿热型 UC 大鼠活动及状态的影响 与空白组比较,模型组在造模过程及造模后体质量进行性减轻,出现大片的毛发脱落,色泽暗淡,精神状态差,刺激后反应迟钝,并出现扎堆蜷卧现象,肛门异常污秽,大便黏腻、恶臭,出现不同程度的灰黑便;在 21 d 芍药汤灌服过程中,高剂量组、柳氮磺吡啶组大鼠精神状态明显改善,毛发逐渐新生,刺激后反应较前灵敏,肛门污秽程度减轻,大便颗粒样,无明显

肠道黏膜的免疫系统发生异常反应导致肠道炎症的发生,如研究发现 TLR4 介导的 TLR4/NF-κB 信号转导通路非特异性的与病原相关分子结合,启动信号转导,使相关的肠道炎症介质的释放,最后导致 UC 的发生<sup>[12]</sup>。HMGB<sub>1</sub> 的主要受体之一 TLRs (TLR2, TLR4) 信号通路<sup>[13-14]</sup>,参与其介导的细胞内信号转导通路活化。HMGB<sub>1</sub> 与 TLR2, TLR4 相互作用,通过 TLR 相关蛋白 MyD88,最终激活 NF-κB,导致大量炎症介质释放,通过正反馈作用使炎症反应放大并延时<sup>[15-16]</sup>。而对于传递上游信息和疾病发生发展中,下游信号因子 MyD88 作为 TLR 信号通路中一个重要接头蛋白,起着非常重要的作用<sup>[17]</sup>。它分别由为 N 端死亡区、与 TIR 结合的羧基末端以及 C 端类似于 IL-1R 胞质区的 Toll 区 3 个功能区域组成。一方面其通过与 IL-1R 相关激酶 (IRAK) 的死亡结构域结合,使 N 端死亡结构域 (DD) 引起

表 2 芍药汤对湿热型 UC 大鼠的 HMGB<sub>1</sub>, MyD88, NF-κB 蛋白的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Shaoyao Tang on colonic HMGB<sub>1</sub>, MyD88 and NF-κB of syndrome UC rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | HMGB <sub>1</sub> /GAPDH  | MyD88/GAPDH               | NF-κB/GAPDH               |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白    | -                     | 1.00 ± 0                  | 1.00 ± 0                  | 1.00 ± 0                  |
| 模型    | -                     | 1.50 ± 0.02 <sup>1)</sup> | 2.20 ± 0.02 <sup>1)</sup> | 1.54 ± 0.02 <sup>1)</sup> |
| 芍药汤   | 6                     | 1.46 ± 0.02 <sup>2)</sup> | 0.75 ± 0.012              | 1.36 ± 0.05 <sup>2)</sup> |
|       | 12                    | 1.35 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 0.93 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 1.08 ± 0.00 <sup>2)</sup> |
|       | 24                    | 1.12 ± 0.00 <sup>2)</sup> | 0.57 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 1.06 ± 0.00 <sup>2)</sup> |
| 柳氮磺吡啶 | 1                     | 1.20 ± 0.00 <sup>2)</sup> | 0.80 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 1.12 ± 0.02 <sup>2)</sup> |

IRAK 自身磷酸化,磷酸化的 IRAK 激活 I-κB,进而引发 NF-κB 的激活和转位以及炎症细胞因子的合成和释放,从而导致机体产生炎症反应;另一方面 MyD88 的 Toll 区在非激活状态下以 MyD88-Toll 相关复合物(Tollip)的形式与 MyD88 下游激酶 IRAK 结合,被配体激活的 TLR 招募 IRAK,使 Tollip 与二聚体解聚,IRAK 发生自身磷酸化,进行信号传递<sup>[18]</sup>,通过下游信号因子 MyD88 使得 NF-κB 通过调节各种炎症介质基因的表达,从而引发炎症反应的瀑布式反应,这种理论在 UC 发病机制中起重要作用,因此 NF-κB 活化可能是 UC 发生发展的关键因素<sup>[19]</sup>。这些研究表明了在 UC 发病的相关机制中,与 HMGB<sub>1</sub> 刺激 TLRs 信号通路引起衔接蛋白 MyD88, NF-κB 活化有着密切的关系。

在中医研究方面,通过对近年文献的研究认为 UC 的发病机制以脾虚为病机之根本,又与肝、肾相关,湿热、痰浊或血瘀等为标,根据不同症状可分为 7 个证型,其中大肠湿热型主要见起病急骤,腹痛拒按,脓血便,里急后重,肛门灼热,舌质红,苔黄腻,脉弦滑数,治则为清热利湿,方用芍药汤或葛根芩连汤加减<sup>[20]</sup>。现代临床及实验研究中运用清热利湿法来治疗 UC 的研究甚多,实验研究证明芍药汤能明显降低胃肠湿热型 UC 结肠黏膜 NF-κB 的活性<sup>[21]</sup>,临床研究发现运用地锦芍药汤口服及灌肠治疗 UC 的效果显著<sup>[22]</sup>,运用清肠化湿方有效改善 UC 大鼠的病变程度<sup>[23]</sup>,认为与激活 PPAR-γ 信号通路,抑制 NF-κB 的激活,减轻炎症反应,促进结肠黏膜修复愈合有关。这些研究均证明运用清热利湿法有着显著效果。本研究选用芍药汤,出自《黄帝内经·素问·病机气宜保命集》,由白芍、黄连、当归、木香、槟榔、甘草、大黄、黄芩、肉桂等组成,具有清热燥湿、调和气血的功效,方中以黄连、黄芩为君药,用其清热燥湿之功入大肠除病因,并配以大黄,清中有泄,泄中有清,使湿热积滞从大便而去;重用白芍养血合

营,缓急止痛,配伍当归养血活血,以达“行血则便脓自愈”之效;木香、槟榔行气导滞,“调气则后重自除”,四药相配,调和气血,是为臣药;加少量肉桂,一方面用其辛热温通之性遏制黄连、黄芩、大黄之苦寒,一方面助当归、白芍行血合营,为佐助兼反佐之药,甘草和中缓急,全方君臣佐使共配,达清、和、养、通之功<sup>[24-27]</sup>。这些都表明了芍药汤对溃疡性结肠炎的治疗有着较好的疗效。

本研究实验结果表明造模成功后的湿热型 UC 大鼠结肠黏膜中 HMGB<sub>1</sub> 明显升高,TLRs 信号通路中 MyD88, NF-κB 亦升高,而通过芍药汤的灌胃治疗后,芍药汤高、中、低剂量组 HMGB<sub>1</sub> 基因表达量下降,在转录和翻译水平明显受到抑制,而芍药汤高、中、低剂量组 MyD88, NF-κB 基因表达性亦降低,并且均以芍药汤高剂量组调控最为显著,这说明了芍药汤能够通过 HMGB<sub>1</sub> 调控 TLRs 信号通路使 MyD88, NF-κB 活化受到抑制来阻止湿热型 UC 的发生,从而为芍药汤治疗湿热型溃疡性结肠炎提供了一定的理论依据。

[参考文献]

[ 1 ] Patrick C, Dubois D, van Heel A. New susceptibility genes for ulcerative colitis[J]. Nat Genet, 2008, 40(6): 686-688.

[ 2 ] Eckmann L, Nebelsiek T, Alexander A, et al. Opposing functions of IKKβ during acute and chronic intestinal inflammation[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2008, 105(39):15058-15063.

[ 3 ] HUANG W, TANG Y, LI L. HMGB<sub>1</sub>, a potent proinflammatory cytokine in sepsis[J]. Cytokine, 2010, 51(2): 119-126.

[ 4 ] Bianchi M E, Manfredi A A. High-mobility group box 1 (HMGB<sub>1</sub>) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity [J]. Immunol Rev, 2007, 220(1): 35-46.

[ 5 ] YANG H, WANG H, Czura C J, et al. The cytokine

- activity of HMGB<sub>1</sub> [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78 (1): 1-8.
- [6] 陆宗海,朱道明,林琳. 高迁移率族蛋白 B1 抗体对结肠炎小鼠结肠黏膜的保护作用[J]. *胃肠病学*, 2010, 15(5):288-291.
- [7] 葛文松,沈天天,周韵斓,等. HMGB<sub>1</sub>/TLR2/NF- $\kappa$ B 在溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中的表达及意义[J]. *中华保健医学杂志*, 2010, 12(6):452-455.
- [8] 徐世军,许应军. TLR 信号途径关键转接分子 MyD88 的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2007, 12(12): 2504-2505.
- [9] 徐世军,沈映君. TLR 信号途径关键转接分子 MyD88 的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2007(12): 2504-2506.
- [10] 王涛,迟伟,刘叶东,等. 加味白头翁汤治疗溃疡性结肠炎(湿热下注型)临床观察[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009, 11(10):121-122.
- [11] 翁一洁,郑学宝. 湿热型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立与研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(10): 2522-2525.
- [12] 刘梦莹. 溃疡性结肠炎的分子研究机制进展[D]. 蚌埠:蚌埠医学院, 2015:1-28.
- [13] van Zoelen M A, YANG H, Florquin S, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation *in vivo* [J]. *Shock*, 2009, 31(3): 280-284.
- [14] Park J S, Gamboni-Robertson F, HE Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(3):C917-C924.
- [15] Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(3):189-201.
- [16] Messmer D, YANG H, Telusma G, et al. High mobility group box protein1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization [J]. *J Immunol*, 2004, 173(1): 307-313.
- [17] Fukata M, Abreu M T. TLR4 signalling in the intestine in health and disease[J]. *Biochem Soci Trans*, 2007, 35(6):1473-1478.
- [18] 吴燕燕,王易. Toll 样受体信号通路中 MyD88 的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(3):262-265.
- [19] 马天宇,富光明,俞鸿飞. 核因子- $\kappa$ B 与溃疡性结肠炎的相关性进展[J]. *国际消化病杂志*, 2014, 34(5): 307-309.
- [20] 刘丹,李桂贤,王雪,等. 中医药治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2017, 3, 33(3): 167-168.
- [21] 罗敏,李帅军,胡响当,等. 芍药汤对胃肠湿热型溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜核因子- $\kappa$ B DNA 结合活性的影响[J]. *中国医药导报*, 2015, 1(12):4-6.
- [22] 徐小兵. 地锦芍药汤口服及灌肠治疗湿热型溃疡性结肠炎的临床效果观察[C]//2016《中国组织化学与细胞化学》杂志临床研究研讨会论文集汇编. 北京: 2016:132.
- [23] 顾培青,沈洪,朱磊,等. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 PPAR- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B 及 MUC2, TFF3 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 2(3):79-85.
- [24] 王移飞,赵党生,王凤仪,等. 芍药汤调节湿热型结肠炎大鼠 JAK2/STAT3 和 SOC3 的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23):97-102.
- [25] 李龙骧. 芍药汤中肉桂治痢浅析[J]. *长春中医药大学学报*, 2011, 27(2):211-211.
- [26] 李卓虹,祝朝富,安佰平,等. 李世杰教授运用“通因通用”法治疗放射性肠炎经验探讨[J]. *中国基层医药*, 2015, 22(3):468-469.
- [27] 董洪飞. 通因通用法探寻及代表方芍药汤配伍特点分析[J]. *中医研究*, 2016, 5(29):51-53.

[责任编辑 全燕]