

# 基于 Nrf2 通路探讨薏苡附子败酱散治疗 溃疡性结肠炎的作用机制

方静<sup>1</sup>, 陈江<sup>2\*</sup>, 彭君伟<sup>1</sup>, 李红林<sup>1</sup>, 姜程帆<sup>1</sup>

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 苏州市中医医院, 江苏 苏州 215000)

**[摘要]** **目的:**探讨薏苡附子败酱散治疗溃疡性结肠炎在抗氧化应激信号通路方面的作用机制研究。**方法:**60只雄性C57BL/6J小鼠随机均分为正常组、模型组、美沙拉秦组、薏苡附子败酱散低、中、高剂量组。除正常组以外,其余各组小鼠均制备成急性期溃疡性结肠炎模型。造模过程中的第3天,薏苡附子败酱散低、中、高剂量组分别给予5.24,10.48,20.96 g·kg<sup>-1</sup>的薏苡附子败酱散药液,美沙拉秦药组给予0.82 g·kg<sup>-1</sup>的美沙拉秦药液;正常组、模型组灌胃给予同体积双蒸水,7 d为1个疗程。实验过程中每日观察小鼠的一般情况,包括体重变化、大便性状以及粪便隐血等等,绘制每组小鼠的疾病活动指数(DAI)评分表格。实验的第10天处死小鼠,取结肠组织做苏木精-伊红(HE)染色、组织病理(HI)评分,测量肠组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA)的含量,免疫组化法检测结肠组织中的核转录因子E-2-相关因子(Nrf2)和血红素加氧-1(HO-1)蛋白表达,以及用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测结肠组织中Nrf2 mRNA表达变化。**结果:**治疗后药物组小鼠与模型组相比,DAI评分明显降低( $P < 0.05$ ),HE染色肠组织结构尚存,HI评分明显降低( $P < 0.05$ );T-SOD在模型组中的含量明显降低( $P < 0.05$ ),在药物组中的含量明显升高( $P < 0.05$ );MDA在模型组中的含量明显增高( $P < 0.05$ ),在药物组中的含量降低( $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示,Nrf2的表达药物组与模型组相比明显升高( $P < 0.05$ );HO-1的表达与模型组相比,薏苡附子败酱散低剂量组差异不大,薏苡附子败酱散高剂量组表达明显增高( $P < 0.05$ )。RT-PCR检测Nrf2 mRNA的表达结果发现,与模型组相比,薏苡附子败酱散高剂量组高表达( $P < 0.05$ )。**结论:**薏苡附子败酱散能够上调Nrf2及其下游抗氧化蛋白HO-1的表达,增加Nrf2 mRNA表达,对溃疡性结肠炎有治疗作用。

**[关键词]** 薏苡附子败酱散; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; 核转录因子E-2-相关因子(Nrf2); 血红素加氧-1(HO-1)

**[中图分类号]** R22;R24;R2-031;R285.5;R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0085-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181052

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180313.1345.012.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-13 15:57

## Mechanism of Action of Yiyi Fuzi Baijiang San on Ulcerative Colitis Based on Nrf2 Pathway

FANG Jing<sup>1</sup>, CHEN Jiang<sup>2\*</sup>, PENG Jun-wei<sup>1</sup>, LI Hong-lin<sup>1</sup>, JIANG Cheng-fan<sup>1</sup>

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

2. Suzhou Hospital TCM, Suzhou 215000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the active mechanism of Yiyi Fuzi Baijiang San in treating ulcerative colitis in antioxidant stress signal pathway. **Method:** Sixty male C57BL/6J mice were randomly divided into six groups, normal group, model group, Mesalazine group, and low, medium and high-dose Yiyi Fuzi Baijiang San groups. Except for the normal group, the other groups of mice were included in the acute ulcerative colitis model. At the 3<sup>rd</sup> day of modeling, low, medium and high-dose Yiyi Fuzi Baijiang San groups were given liquid Chinese medicine with doses of 5.24, 10.48, 20.96 g·kg<sup>-1</sup>. The Mesalazine drug group was treated with 0.82 g·kg<sup>-1</sup> of

**[收稿日期]** 20171121(020)

**[基金项目]** 苏州市中西医结合学会科研基金项目(SYSD2017175)

**[第一作者]** 方静,硕士,从事中医药防治胃肠病的实验和临床研究,E-mail:741794791@qq.com

**[通信作者]** \*陈江,副主任医师,硕士生导师,从事中医药防治胃肠病的实验和临床研究,E-mail:cj09203@163.com

mesalazine solution. Normal group and model group were intragastrically given the same volume of double distilled water. A course of treatment was 7 days. Weight changes, stool traits and fecal occult blood of the mice were observed, and the disease activity index (DAI) score curve was drawn for each group of mice. The mice were put to death on the 10<sup>th</sup> day of the experiment; colon tissues were taken for hematoxylin-eosin (HE) staining and HI scoring; the contents of total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA) in intestinal tissues were measured; and the expression of Nrf2 and hemeoxygenase (HO) -1 protein in colon tissues were detected by immunohistochemical method. The changes in Nrf2 mRNA expression in tissues were detected by RT-PCR. **Result:** Compared with the model group, the DAI score of the drug-treated mice decreased significantly ( $P < 0.05$ ), the histological structure of the intestinal mucosa was survived, and the HI score decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The content of T-SOD in the model group was significantly lower ( $P < 0.05$ ), and significantly higher in the drug groups ( $P < 0.05$ ); the content of MDA in the model group was significantly higher ( $P < 0.05$ ) and decreased in the drug group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry showed that the expression of Nrf2 was significantly increased in the drug-treated groups compared with the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the expression of HO-1 in the low-dose group was not significantly different. High-dose group was significantly higher ( $P < 0.05$ ). RT-PCR detection of Nrf2 mRNA expression found that compared with the model group, high-dose group showed a high expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Yiyi Fuzi Baijiang San can up-regulate the expression of Nrf2. Its downstream antioxidant protein HO-1 can increase the Nrf2 mRNA expression and have a therapeutic effect on ulcerative colitis.

[ **Key words** ] Yiyi Fuzi Baijiang San; ulcerative colitis; oxidative stress; Nrf2; hemeoxygenase-1 (HO-1)

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种肠道非特异性免疫疾病, 病因不明确, 病程长, 易复发易癌变<sup>[1]</sup>, 是临床难治性疾病之一<sup>[2]</sup>。本病严重影响患者的生活质量, 造成身体和心理的双重折磨, 且治疗导致的社会经济负担过重<sup>[3-4]</sup>。UC 在中医学中属于“肠痈”等范畴, 多与饮食不节、情志失调、先天禀赋不足、外感六淫邪气及久病血瘀肠络有关。薏苡附子败酱散, 出自张仲景《金匮要略》, 是治疗“肠痈”的代表方。临床上用薏苡附子败酱散治疗 UC 疗效显著, 有减少不良反应、减少激素依赖及抵抗、提高患者生活质量的优势<sup>[5-7]</sup>。研究表明, 薏苡附子败酱散可以纠正 UC 大鼠体内炎症因子的失衡状态, 促进结肠黏膜的修复<sup>[8]</sup>。

UC 的炎性肠道环境易导致中性粒细胞和巨噬细胞产生大量活性氧和活性氮<sup>[9]</sup>, 进而激发体内的氧化应激机制, 氧化应激会损伤肠道中的上皮屏障功能, 因此氧化应激被认为是 UC 诱导和进展的潜在推动力。研究表明, 激活核转录因子 E-2-相关因子 (Nrf2)/血红素加氧-1 (HO-1) 介导的抗氧化应激机制可以有效缓解 UC 的病情进展<sup>[10]</sup>。此外, 薏苡附子败酱散有调节免疫, 抗氧化的作用<sup>[11]</sup>。本实验前期成功复制了 UC 小鼠模型, 在此基础上对薏苡附子败酱散治疗 UC 小鼠的作用及机制进行研究,

为临床推广薏苡附子败酱散应用于防治 UC 提供研究思路和实验依据, 揭示中医药疗法防治 UC 潜在价值与意义。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只, 无特殊病原体 (SPF) 级, 体质量 18 ~ 22 g, 购自昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司, 合格证号 SCXK (苏) 2013-0003, 本动物实验严格遵守上海中医药大学实验动物伦理委员会的要求。

**1.2 药物** 薏苡附子败酱散由薏苡仁、附子、败酱草组成 (苏州市春晖堂药业有限公司, 批号均为 201707), 由苏州市中医医院主任药师张露荣鉴定均为正品; 美沙拉秦缓释颗粒 (Mesalazine SR Granules, 上海爱的发制药有限公司, 国药准字 H20143164, 规格 0.5 g/袋)。

**1.3 试剂** 葡聚糖硫酸钠盐 (DSS, 相对分子质量 36 000 ~ 50 000, 美国 MP 公司, 批号 Q4299), 用时溶于蒸馏水制成 3% DSS 溶液, 每隔 1 d 更换新鲜的 3% DSS 溶液; 粪便隐血试剂盒 (珠海贝索生物技术有限公司, 粤食药监械生产许 20010407 号); 总超氧化物歧化酶 (T-SOD), 丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物科技有限公司, 批号 20170331); 抗 HO-1 抗体, 抗 Nrf2 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号分别为

ab13243, ab31163); RNA 提取液(上海优选生物科技有限公司, 货号 YX1008); trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司); 第一链 cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo 公司, 货号 K1622)。

**1.4 仪器** ASP300S 型组织脱水机, EG1150 型石蜡包埋机, RM2016 型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司); Eclipse CI 型正置光学显微镜, DS-U3 型成像系统(日本 Nikon 公司); SQ2125 型石蜡切片机, PPTHK-21B 型摊片机(徠克公司); HI1210 型水浴锅(德国 Leica 公司); Bead Ruptor 12 型多样品研磨珠均质仪(美国 Omni 公司); D3024R 台式高速冷冻型微量离心机(北京 Dragon Lab 公司); T-100 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); NanoDrop2000 型微量分光光度计(美国 Thermo 公司); FBZ2001-up-p 型标准试剂型纯水仪(青岛富勒姆科技有限公司); Image-pro plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模和分组** 按随机数字表将 60 只小鼠分为正常组, 模型组, 美沙拉秦组, 薏苡附子败酱散低、中、高剂量组, 每组 10 只。除正常组以外, 其余各组小鼠均自由饮用 3% DSS 溶液连续 7 d, 建立小鼠 UC 动物模型<sup>[12]</sup>。

**2.2 药物的制备** 薏苡附子败酱散按原方药物配比组成(薏苡仁 30 g, 附子 6 g, 败酱草 15 g), 先将药物浸泡 30 min, 蒸馏水煎煮提取 2 次, 过滤后合并提取液, 浓缩成生药质量浓度分别为 0.262, 0.524, 1.048 g·mL<sup>-1</sup>的浸膏, 冷却过滤除菌分装, 置于 4℃ 冰箱保存备用; 将美沙拉秦缓释颗粒研磨并用 100 目筛筛过, 最后与蒸馏水配制成 0.041 g·mL<sup>-1</sup> 质量浓度的混悬药液, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

**2.3 给药** 造模的第 3 天, 各组小鼠分别按下述剂量灌胃给药 7 d。薏苡附子败酱散低、中、高剂量组分别给予 5.24, 10.48, 20.96 g·kg<sup>-1</sup> 的薏苡附子败酱散药液, 美沙拉秦组给予 0.82 g·kg<sup>-1</sup> 的美沙拉秦药液<sup>[13]</sup>; 正常组、模型组灌胃给予同体积双蒸水。实验过程中每日观察小鼠的一般情况, 包括体质量变化, 大便性状, 并且每日观察或用粪便隐血试纸检测大便带血情况等等。按疾病活动指数(DAI)评分标准(表 1)进行评分, 得出每只小鼠 DAI 评分<sup>[14]</sup>。

**2.4 标本的采集和处理** 第 9 天给药后, 禁食 1 d, 第 10 天麻醉摘眼球取血后颈椎脱臼法处死小鼠, 立即用消毒过的镊子及剪刀剪开腹腔, 游离结肠及远端回肠, 取出肛门至盲肠末端的整个肠段, 迅速沿着

表 1 DAI 评分标准

Table 1 Disease activity index (DAI) scoring system

体质量下降/%	大便性状	大便隐血/肉眼血便	分数
0	正常	正常	0
1~5	松散	OB+	1
6~10	-	-	2
11~15	稀便	肉眼	3
>15	-	-	4

注: DAI 是用于评估肠道炎症程度的临床标准。每个类别的得分加起来除以 3 后的得分就是 DAI。

肠系膜纵轴抛开, 用预冷生理盐水漂洗干净, 然后将结肠平展开, 仔细观察肠黏膜的溃疡和炎症情况。

**2.5 苏木素-伊红(HE)染色病理检查** 取病变处结肠组织, 沿纵轴切开, 常规固定、石蜡切片、HE 染色, 普通光镜下观察结肠的病理组织学改变情况, 主要对结肠组织炎症轻重, 病变深度, 隐窝和上皮破坏情况进行评价, 组织学损伤程度按病理评分(HI)标准(表 2)进行评分<sup>[14]</sup>。

表 2 HI 评分标准

Table 2 Histological colitis scoring system

评估指标	病变特征	分数
炎症	无	0
	轻度	1
	中度	2
病变程度	重度	3
	无	0
	黏膜肌层	1
隐窝损伤	肌层	2
	浆膜层	3
	无	0
	基底 1/3 隐窝损伤	1
隐窝损伤	基底 2/3 隐窝损伤	2
	仅有完整表面上皮	3
	全部上皮破坏	4

注: HI 是评估炎症严重程度的组织学标准, 得分从 0 到 10 分, 所以评分均由不知道组别的病理科人员评估。

**2.6 黄嘌呤氧化酶法测定结肠组织中 T-SOD 的活力、硫代巴比妥酸(TBA)法测量结肠组织中 MDA 的含量** 将结肠组织取出, 进行匀浆处理, 制成 5% 的匀浆液。严格按试剂盒的处理步骤, 用黄嘌呤氧化酶法测出肠组织 T-SOD 的活力; 用 TBA 法测出肠组织 MDA 的含量。

**2.7 免疫组化法检测结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 的**

表达 将需要的组织置于甲醛中固定 48 h; 经过一系列操作后石蜡切片为 4 ~ 7 μm 厚度; 切片脱蜡、水化后抗原修复; 阻断、封闭后加一抗(1:1 000), 二抗后继续操作, 3,3'-四盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色。阳性细胞呈黄色、棕黄色、棕黑色不等。按免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法对 Nrf2 和 HO-1 进行分析。采用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司), 在 200 高倍视野下计阳性细胞个数以及作出评分。

**2.8 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测结肠组织中 Nrf2 mRNA 表达变化** trizol 法提取结肠组织中的总 RNA; 按反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。经英潍捷基引物合成公司设计引物 β-actin 上游 5'-GTTCCCTACCCCAATGTGTCC-3', 下游 5'-TAGCCCAAGATGCCCTTCAGT-3' (125 bp); Nrf2 上游 5'-CTGGCTGATACTACCGCTGTTC-3', 下游 5'-AGGTGGGATTGAGTCTAAGGAG-3' (208 bp)。PCR 反应体系为 2 × qPCR Mix 12.5 μL, 7.5 μmol·L<sup>-1</sup> 基因引物 2.0 μL, 反转录产物 2.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.0 μL。PCR 扩增条件预变性 95 °C, 10 min; 循环(40 次)95 °C, 15 s 60 °C, 60 s 75 °C 95 °C, 每 20 s 升温 1 °C。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在紫外灯下检测条带。以 β-actin 作为内参, 以目的基因/β-actin 表示 mRNA 相对表达水平。

**2.9 统计学分析** 应用 SPSS 19.0 统计软件, 所有实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 符合正态分布资料采用单因素方差分析检验; 若为非正态分布资料采用 Mann-Whitney U 秩和检验来比较两组间差异是否有统计学意义。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 薏苡附子败酱散对各组小鼠一般情况的影响

正常组小鼠实验过程中精神状况好, 饮食饮水正常, 大便正常, 活动敏捷, 毛发顺滑光亮, 体质量随时间有所增加。模型组小鼠的随着实验天数的增加饮食饮水逐渐减少, 毛发杂乱, 精神状态差; 在实验过程中的第 5 天部分小鼠出现肉眼松散血便, 体质量下降, 第 6 ~ 7 天全部小鼠出现肉眼稀血便, 全部小鼠体质量下降; 停药后的第 8 ~ 10 天小鼠体质量继续下降, 大便稀血便。薏苡附子败酱散低、中、高剂量组和美沙拉秦组小鼠随着实验天数的增加饮食饮水有所减少, 体质量有所下降, 但其变化程度均较模型组好。美沙拉秦组小鼠在实验的第 6 天有少部分小鼠出现肉眼松散血便; 薏苡附子败酱散低、中剂量组在实验第 6 ~ 7 天有部分出现肉眼稀血便; 薏苡附

子败酱散高剂量组小鼠在实验第 7 天有 1 只小鼠出现肉眼松散血便。各组小鼠 DAI 评分比较, 各组 DAI 评分在实验第 4 天开始明显增加。与正常组相比, 模型组的 DAI 评分增高(P < 0.01); 药物干预后, 与模型组比较, 薏苡附子败酱散低剂量组的 DAI 评分无差异的降低; 美沙拉秦组和薏苡附子败酱散高、中剂量组的 DAI 评分明显降低(P < 0.05, P < 0.01)。薏苡附子败酱散高、中剂量组与西药组的 DAI 评分无明显的统计学差异。见表 3。

表 3 薏苡附子败酱散对各组小鼠 DAI 评分的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 3 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang San on DAI score of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	5 d	9 d
正常	-	0	0
模型	-	1.200 ± 0.322 <sup>2)</sup>	2.600 ± 0.265
薏苡附子败酱散	5.24	1.033 ± 0.187 <sup>2)</sup>	2.366 ± 0.332 <sup>4)</sup>
	10.48	1.001 ± 0.272 <sup>2,3)</sup>	1.768 ± 0.447 <sup>2)</sup>
	20.96	0.534 ± 0.176 <sup>2,4)</sup>	1.399 ± 0.307 <sup>2)</sup>
美沙拉秦	0.82	0.602 ± 0.021 <sup>2,4)</sup>	1.500 ± 0.480 <sup>2)</sup>

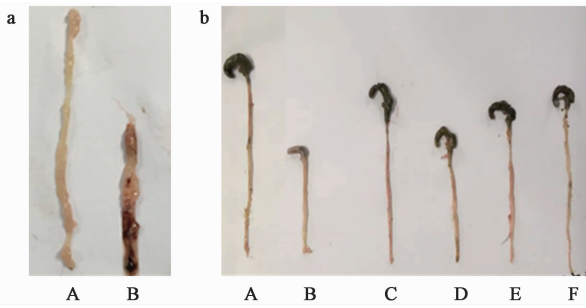
注: DAI 评分在实验的第 4 天后才增加。与正常组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01; 与模型组比较<sup>3)</sup> P < 0.05, <sup>4)</sup> P < 0.01(表 4 ~ 7 同)。

#### 3.2 薏苡附子败酱散对各组小鼠结肠组织病理学和病理学评分的影响

小鼠解剖后的观察发现模型组小鼠结肠内部黏膜与正常组小鼠结肠内部黏膜相比明显充血水肿, 结肠长度萎缩; 美沙拉秦组和薏苡附子败酱散低、中、高剂量组结肠外观比模型组稍改善, 见图 1。HE 染色显示各组小鼠结肠结肠组织病理学改变。正常组结肠组织黏膜完整, 腺体排列整齐, 未见溃疡。模型组结肠黏膜有缺损, 腺体结构分离, 大量中性粒细胞浸润, 隐窝损伤。薏苡附子败酱散低剂量组病理组织结构与模型组相似。薏苡附子败酱散中剂量组结肠黏膜有缺损, 隐窝损伤, 部分中性粒细胞浸润, 可见部分腺体结构。美沙拉秦组与薏苡附子败酱散高剂量组结肠组织结构大体完整, 腺体结构相对完整, 少量中性粒细胞浸润, 未见明显隐窝损伤。见图 2。各组小鼠病理组织 HI 评分见表 4。

#### 3.3 薏苡附子败酱散对结肠组织中 T-SOD, MDA 水平的影响

结果表明 T-SOD 的活性在模型组显著下降(P < 0.01); 在药物组中显著升高(P < 0.01)。薏苡附子败酱散低剂量组与中剂量组无差异性表达, 薏苡附子败酱散高剂量组与美沙拉秦组无差异性表达(表 5)。模型组中 MDA 的表达显著



A. 正常组; B. 模型组; C. 美沙拉秦组; D~F. 薏苡附子败酱散低、中、高剂量组(图 2~4 同)

a. 结肠内部黏膜直观图, 长度依次为 7.9, 4.5, 4.5 cm; b. 结肠外部直观图, 长度依次为 8.1, 4.4, 6.1, 5.0, 5.4, 6.8 cm

图 1 薏苡附子败酱散对各组小鼠结肠外观与长度的影响

Fig. 1 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang San on colon appearance and length of mice in each group

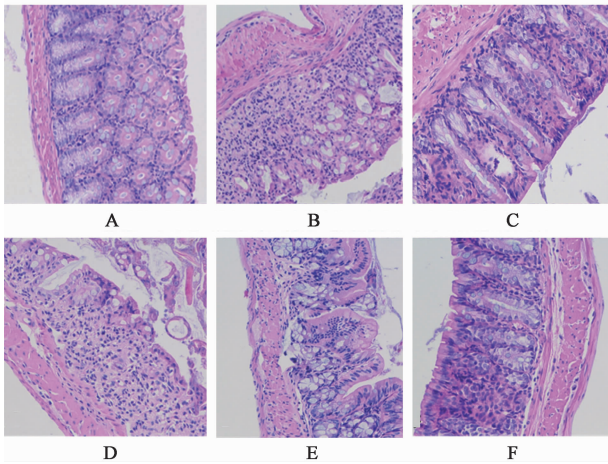


图 2 薏苡附子败酱散对结肠组织病理组织学的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang San on histopathological of colon tissues of mice in each group(HE, ×200)

表 4 薏苡附子败酱散对各组小鼠病理图片 HI 评分的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang San on pathology picture HI score chart on each groups of mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	HI/分
正常	-	0
模型	-	$9 \pm 0.707^{2)}$
薏苡附子败酱散	5.24	$8.4 \pm 0.548^{2)}$
	10.48	$5.6 \pm 1.140^{2,4)}$
	20.96	$3.6 \pm 0.548^{2,4)}$
美沙拉秦	0.82	$3.8 \pm 0.837^{2,4)}$

升高( $P < 0.01$ ), 药物组中 MDA 的含量比模型组降低( $P < 0.01$ )。薏苡附子败酱散高、中剂量组与美沙拉秦组中 MDA 无差异性表达(表 5)。这些结果

表明薏苡附子败酱散具有抗氧化作用, 可以在一定程度上抑制氧化损伤。

表 5 薏苡附子败酱散对小鼠结肠组织中 T-SOD, MDA 水平表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang San on expression of T-SOD and MDA in colon tissues of mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	T-SOD/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	$192.899 \pm 4.488$	$1.220 \pm 0.374$
模型	-	$131.497 \pm 13.410^{2)}$	$3.126 \pm 0.683^{2)}$
薏苡附子败酱散	5.24	$143.916 \pm 9.389^{2,3)}$	$2.354 \pm 0.655^{2,4)}$
	10.48	$150.202 \pm 12.943^{2,3)}$	$2.021 \pm 0.536^{2,4)}$
	20.96	$170.262 \pm 9.238^{2,4)}$	$1.517 \pm 0.528^{4)}$
美沙拉秦	0.82	$164.341 \pm 15.430^{2,4)}$	$1.621 \pm 0.544^{4)}$

### 3.4 薏苡附子败酱散对结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

正常组中 Nrf2 少量存在于胞浆中, 呈现浅棕黄色; 模型组中 Nrf2 存在胞浆和细胞核中, 呈现不均一的棕黄色, 弱阳性表达; 薏苡附子败酱散低、中、高剂量组和美沙拉秦组中 Nrf2 均出现在胞浆和细胞核中, 不同程度的深棕黄色颗粒表达, 其中薏苡附子败酱散中剂量组和美沙拉秦组的 Nrf2 表达差异不大, 薏苡附子败酱散高剂量组强阳性表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。HO-1 主要存在于胞浆中, 正常组少量出现或不出现浅棕黄色表达; 模型组胞浆中 HO-1 出现棕黄色弱阳性表达, 与薏苡附子败酱散低剂量组比差异性不大; 薏苡附子败酱散中、高剂量组和美沙拉秦组中 HO-1 在胞浆中呈现不同程度的深棕黄色颗粒表达, 其中薏苡附子败酱散中剂量组和美沙拉秦组的 HO-1 表达差异性不明显, 薏苡附子败酱散高剂量组出现深棕色, 强阳性表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3, 表 6。

### 3.5 薏苡附子败酱散对结肠组织中 Nrf2 mRNA 的表达的影响

与正常组相比, 其余各组 Nrf2 mRNA 的表达明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 各给药组 Nrf2 mRNA 的表达明显升高( $P < 0.05$ )。薏苡附子败酱散低、中剂量组、美沙拉秦组的 Nrf2 mRNA 的表达差异性不明显, 不具有统计学意义。薏苡附子败酱散高剂量组 Nrf2 mRNA 的表达比其余各组明显升高( $P < 0.05$ )。见图 4, 表 7。

## 4 讨论

胃肠道是身体的消化和吸收器官, 经常遭受异生物质和内源性有毒物质诱导的氧化损伤。肠上皮是机体自身与外环境接触的最大界面, 具有选择性渗透吸收营养物质和防御肠道内微生物及致炎因子入侵等屏障功能。其主要起到阻止肠腔内有害物质

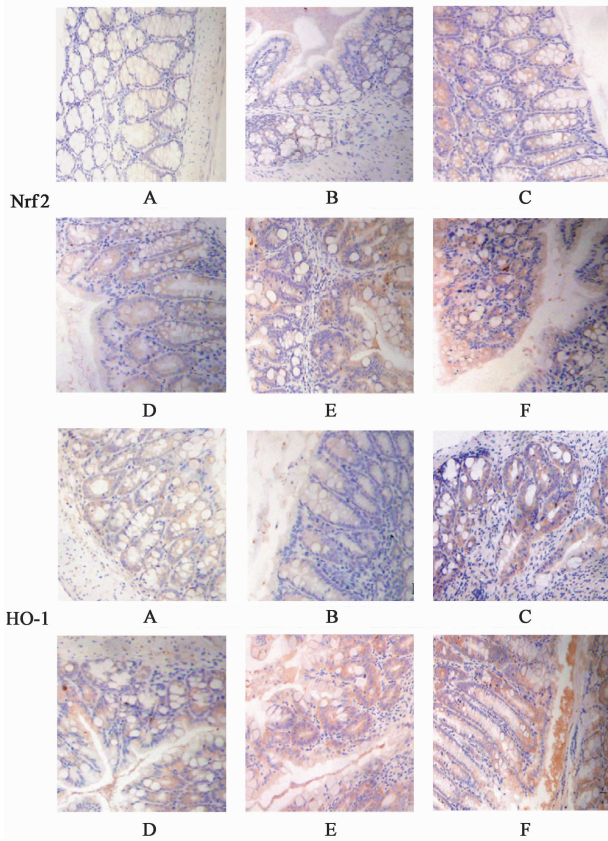


图 3 薏苡附子败酱散对小鼠结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达的影响 (IHC, ×200)

Fig. 3 Effect of Yi Yi Fu Zi Bai Jiang San on immunohistochemical Nrf2, HO-1 staining results of colonic tissue of mice (IHC, ×200)

如致病微生物、抗原和促炎因子进入血液循环的作用。当肠道内氧自由基增加时,就会损伤肠道黏膜组织,造成肠黏膜通透性增高,肠道细菌移位和促炎因子大量释放,从而加重原发疾病,甚至诱发多脏器功能紊乱和衰竭<sup>[15]</sup>。氧化应激与胃炎、胃溃疡、胃癌、克罗恩病,UC 和结肠直肠癌等胃肠道疾病有关。因此,研究氧化应激对胃肠道疾病的潜在影响意义巨大。Nrf2/HO-1 路径是机体最主要的抗氧化应激反应通路之一,参与机体肿瘤、细胞凋亡、炎症反应、黏膜修复等多方面<sup>[16-17]</sup>。Nrf2 属于核转录因子家族,主要参与调节细胞氧化应激反应,研究发现结肠组织中 Nrf2 的表达量随 UC 的氧化应激强度而增加<sup>[18]</sup>。在基础条件下,Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷结合蛋白 1 (Keap1) 结合驻留在细胞质中(被抑制状态)<sup>[19]</sup>;当受到氧化应激信号刺激后,Nrf2 迅速与 Keap1 解耦连,转入细胞核,与小 Maf 蛋白结合形成异二聚物,并与一顺式作用元件即抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合,诱导下游一系列 II 相解毒酶及抗氧化酶基因的转录与调控<sup>[20-22]</sup>,如 HO-1,苯醌氧化还原酶 (NQO1),尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (UGT1A1),谷胱甘肽 S-转移酶 M1 (GSTM1) 等,参与对抗氧自由基引起的氧化应激。HO-1 是热休克蛋白 32,具有抗氧化、抗凋亡、抗增殖、抗炎、抗肿瘤及抑制血小板聚集作用,

表 6 薏苡附子败酱散对小鼠结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 的阳性细胞数和评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 6 Effect of Yi Yi Fu Zi Bai Jiang San on positive cell number and score expression of Nrf2 and HO-1 in colon tissues of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nrf2 细胞/个/mm <sup>2</sup>	Nrf2 评分/分	HO-1 细胞/个/mm <sup>2</sup>	HO-1 评分/分
正常	-	942.00 ± 215.67	0.33 ± 0.52	1 255.67 ± 196.59	0.50 ± 0.55
模型	-	1 529.33 ± 104.31 <sup>2)</sup>	1.33 ± 0.52 <sup>1)</sup>	179.33 ± 170.42 <sup>1)</sup>	1.17 ± 0.41 <sup>1)</sup>
薏苡附子败酱散	5.24	1 857.83 ± 182.07 <sup>2,3)</sup>	1.50 ± 0.55 <sup>2)</sup>	163.00 ± 326.28 <sup>1,3)</sup>	1.50 ± 0.55 <sup>1)</sup>
	10.48	2 433.83 ± 241.60 <sup>2,4)</sup>	2.33 ± 0.52 <sup>2,3)</sup>	213.33 ± 201.54 <sup>2,4)</sup>	2.17 ± 0.41 <sup>2,3)</sup>
	20.96	3 198.83 ± 189.83 <sup>2,4)</sup>	2.83 ± 0.41 <sup>2,4)</sup>	262.67 ± 215.34 <sup>2,4)</sup>	2.83 ± 0.41 <sup>2,4)</sup>
美沙拉秦	0.82	2 602.50 ± 380.54 <sup>2,4)</sup>	2.33 ± 0.52 <sup>2,3)</sup>	208.67 ± 308.19 <sup>2,4)</sup>	2.33 ± 0.52 <sup>2,4)</sup>

注:阳性细胞计数法(个/mm<sup>2</sup>),在 400 倍光镜下,随机选择不重叠的 10 个视野,机器计数。评分法(染色程度),按染色程度分,0,1,2,3 分代表阴性着色、淡棕黄色、棕黄色、深棕黄色。

广泛存在于机体各个器官或组织内,一般不表达或少表达。当机体受到氧化刺激后,在 ARE 的调节下迅速转录活化,参与机体抗氧化应激防御机制<sup>[23-24]</sup>。SOD,MDA 是机体氧化应激的重要标志物,实验研究报道证明由 DSS 诱导的 UC 小鼠体内的 SOD 降低,MDA 升高,这与我们的实验结果相符合。

本研究制备 UC 动物模型模拟临床溃疡性结肠炎的活动期,采用人与动物药物等效剂量换算的方

法给予小鼠低、中、高剂量灌胃治疗,结果发现实验第 5 天后,美沙拉秦组和薏苡附子败酱散中、高剂量组小鼠的 DAI 评分明显低于模型组;药物组结肠外观充血水肿改善,长度比模型组短,接近于正常组。HE 染色病理检查发现药物组结肠黏膜病变明显好于模型组,HI 评分低于模型组。因此可推测薏苡附子败酱散治疗 UC 有效,与临床研究相符合<sup>[25-26]</sup>。

Nrf2<sup>-/-</sup> 小鼠已成功应用于 UC 实验模型,与野

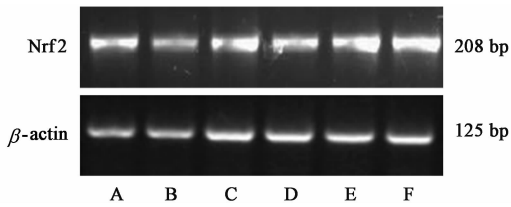


图 4 薏苡附子败酱散对小鼠结肠组织中 Nrf2 mRNA 表达电泳  
Fig. 4 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang San on expression of Nrf2 mRNA in colon tissues of mice

表 7 薏苡附子败酱散对小鼠结肠组织中 Nrf2 mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang San on relative mRNA expression of Nrf2 in colon tissues of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nrf2/β-actin
正常	-	1.85 ± 0.14
模型	-	2.53 ± 0.12 <sup>1)</sup>
薏苡附子败酱散	5.24	3.67 ± 0.29 <sup>3)</sup>
	10.48	3.12 ± 0.12 <sup>3)</sup>
	20.96	3.60 ± 0.18 <sup>3)</sup>
美沙拉秦	0.82	4.46 ± 0.20 <sup>4)</sup>

生型小鼠相比, Nrf2 基因缺陷小鼠的便血情况加重, 结肠长度明显缩短; Nrf2<sup>-/-</sup> 小鼠通过减少抗氧化酶并增加促炎因子的表达而对 DSS 诱导的 UC 有高度易感性<sup>[27]</sup>。另一项研究表明当 Nrf2 在结肠组织中表达增加时, 炎症情况明显改善, 证明 Nrf2 对结肠有保护作用<sup>[27]</sup>。小鼠炎症性肠病模型中, 炎症区的肠黏膜的 HO-1 活性及 HO-1 基因的表达显著增加, HO-1 的诱导剂处理后, 肠道黏膜中的 HO-1 显著上升, 肠道黏膜损伤减轻, 说明其可以缓解肠黏膜损伤, 表明 HO-1 对小鼠肠黏膜损伤有保护作用<sup>[28]</sup>。本研究应用免疫组织化学染色法检测小鼠结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达变化, 结果发现在表达 Nrf2 方面, 与模型组相比, 薏苡附子败酱散低、中、高剂量组呈现递增形式的明显差异性增高, 美沙拉秦组表达与薏苡附子败酱散中剂量组相差不大; 在表达 HO-1 方面, 与模型组相比, 薏苡附子败酱散低剂量无差异性, 薏苡附子败酱散中、高剂量组明显差异性增高, 美沙拉秦组与薏苡附子败酱散中剂量组相比差异不大。表明薏苡附子败酱散能够上调 Nrf2 及其下游抗氧化蛋白 HO-1 的表达, 对 UC 有治疗作用。PCR 结果发现, 药物组与模型组相比, Nrf2 mRNA 的表达明显升高, 其中美沙拉秦组与薏苡附子败酱散低、中剂量组表达无差异。表明薏苡附子败酱散能够增加 Nrf2 mRNA 表达, 促进其诱导下游

抗氧化酶和解毒酶的表达, 达到抗氧化应激的作用。本实验通过建立 UC 动物模型, 应用薏苡附子败酱散治疗 UC, 初步证实了薏苡附子败酱散基于 Nrf2 通路治疗 UC 的作用机制。炎症性肠病的研究已经涉及到氧化应激<sup>[29-31]</sup>, 这对炎症的发生至关重要, 也是疾病恶化的直接相关因素。因此, 进一步且持续地研究薏苡附子败酱散基于 Nrf2 信号通路治疗 UC 的作用效点非常必要。未来可以在基础和分子水平、药代动力学和代谢方面, 评估薏苡附子败酱散治疗 UC 的有效性, 为临床上治疗 UC 的替代抗氧化剂治疗提供潜在的治疗药物。

[参考文献]

[ 1 ] Farraye F A, Odze R D, Eaden J, et al. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease [ J ]. Gastroenterology, 2010, 138( 2 ): 746-774.

[ 2 ] Caroline K, Maximilien B, Marion D, et al. Management of diagnosis and treatment in ulcerative colitis [ J ]. Presse Med, 2015, 44( 2 ): 144-149.

[ 3 ] Baumgart D C, Sandborn W J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies [ J ]. Lancet, 2007, 369( 9573 ): 1641-1657.

[ 4 ] Kappelman M D, Rifas-Shiman S L, Porter C Q, et al. Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in US children and adults [ J ]. Gastroenterology, 2008, 135( 6 ): 1907-1913.

[ 5 ] 林燕萍, 叶柏, 宁丽琴. 叶柏运用古方治疗溃疡性结肠炎经验 [ J ]. 辽宁中医杂志, 2016, 43( 11 ): 2277-2279.

[ 6 ] 祝景旭, 周正华. 周正华治疗溃疡性结肠炎经验 [ J ]. 湖南中医杂志, 2015, 31( 11 ): 42-43.

[ 7 ] 张乐乐, 祝慧芳, 江一平. 江一平运用薏苡附子败酱散加味治疗溃疡性结肠炎验案 1 则 [ J ]. 江西中医药, 2017, 4( 48 ): 50-51.

[ 8 ] 张双喜, 史仁杰. 薏苡附子败酱散对 TNBS 结肠炎模型大鼠 Treg/Th17 的影响 [ J ]. 世界华人消化杂志, 2014, 11( 3 ): 1542-1546.

[ 9 ] Banan A, ZHANG L J, Farhadi A, et al. Critical role of the atypical ( lambda ) isoform of protein kinase C ( PKC-( lambda )) in oxidant-induced disruption of the microtubule cytoskeleton and barrier function of intestinal epithelium [ J ]. Pharmacol Exp Ther, 2005, 312( 2 ): 458-471.

[ 10 ] Bryan H K, Olayanju A, Goldring C E, et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and-independent mechanisms of regulation [ J ]. Biochem Pharmacol,

- 2013,85(6):705-717.
- [11] 彭金咏. 薏苡附子败酱散的药效物质基础、制备工艺及药效学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2006.
- [12] Solomon L, Mansor S, Mallon P, et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview [J]. *Comp Haematol Int*, 2010, 19(3):235-239.
- [13] 黄继汉, 黄晓辉, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- [14] Kihara N, Fuente S G, Fujino K, et al. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats[J]. *Gut*, 2003, 52(5):713-719.
- [15] Dincer Y, Erzin Y, Himmetogiu S. et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(7):1636-1641.
- [16] CUI W, BAI Y, MIAO X, et al. Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012:821936.
- [17] 张玉琴, 李鹭, 李煌, 等. 枯楼桂枝颗粒激活 Nrf2 信号通路减轻脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激损伤作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21):112-116.
- [18] Harder B, JIANG T, WU T, et al. Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(4):680-686.
- [19] 周艳利, 刘丽, 宋书霞, 等. Nrf2 在溃疡性结肠炎患者中的表达及其与氧化应激的关系[J]. *中华消化杂志*, 2014, 34(13):401-403.
- [20] KANG M I, Kobayashi A, Wakabayashi N, et al. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(7):2046-2051.
- [21] Ishii T, Itohk K, Takahashi S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(21):16023-16029.
- [22] ZHANG D D, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(22):8137-8151.
- [23] Pejman H A, Raheleh H, Parisa B, et al. Adenovirus-mediated expression of the HO-1 protein within MSCs decreased cytotoxicity and inhibited apoptosis induced by oxidative stresses [J]. *Cell Stress Chaperon*, 2012, 17(2):181-190.
- [24] Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, et al. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling[J]. *J Mol Med*, 2008, 86(3):267-279.
- [25] 赵琰. 王庆国教授学术思想、临床经验总结及其治疗脾胃病的用药规律研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [26] 笪如桥. 袁红霞调和寒热法论治脾胃病临证举隅[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(2):158-159.
- [27] Khor T O, HUANG M T, Kwon K H, et al. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24):11580-11584.
- [28] 李都, 姚雨杉, 张雪辰, 等. 糖肾安对高糖环境下人肾系膜细胞 Nrf2/ARE 通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24):159-163.
- [29] 王移飞, 赵党生, 王凤仪, 等. 芍药汤调节湿热型溃疡性结肠炎大鼠 JAK2/STAT3 和 SOCS3 的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23):97-102.
- [30] Aslan M, Nazligu Y, Bolukbas C, et al. Peripheral lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with ulcerative colitis[J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2011, 121(7/8):223-229.
- [31] Abreu M T, Sparrow M P. Translational research in inflammatory bowel disease[J]. *Mt Sinai J Med*, 2006, 73(8):1067-1073.

[责任编辑 全燕]