

乌梅丸拆方对 UC 大鼠结肠上皮细胞 Notch 信号通路的影响

惠毅¹, 闫曙光^{1,2*}

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省胃肠病证方药省级重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:**观察乌梅丸拆方对溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞 Notch 信号通路的影响,揭示方中治疗溃疡性结肠炎的主要治法和药物。**方法:**以三硝基甲苯磺酸/乙醇灌肠建立大鼠溃疡性结肠炎模型。将80只大鼠随机分成8组:空白组(生理盐水 10 mL·kg⁻¹),模型组(生理盐水 10 mL·kg⁻¹),乌梅丸全方组(53.2 g·kg⁻¹),寒热并用组(36.0 g·kg⁻¹),温热药物组(21.32 g·kg⁻¹),寒凉药物组(14.68 g·kg⁻¹),补益药物组(6.68 g·kg⁻¹),收敛药物组(10.68 g·kg⁻¹),造模8h后各组大鼠按剂量灌胃给药,给药10d。取结肠组织做病理学检查并采用实时荧光定量核酸扩增检测系统(Q-PCR)法检测结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1, Math-1 mRNA 的表达。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1 mRNA 表达显著增强, Math-1 mRNA 表达降低($P < 0.05$);与模型组比较,乌梅丸及各拆方给药后,乌梅丸组,寒热并用组大鼠结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1 mRNA 表达明显降低, Math-1 mRNA 表达显著增高($P < 0.05$)。**结论:**乌梅丸方中对 Notch 信号通路有调节作用的主要是寒热并用组药物,寒热并用法是治疗溃疡性结肠炎的主要治法。

[关键词] 乌梅丸; 溃疡性结肠炎; 结肠上皮细胞; Notch 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0114-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070114

Effect of Wumei Pill and Its Subdivisions on Notch Signal Pathway in Colonic Epithelial Cells of Ulcerative Colitis in Rats HUI Yi¹, YAN Shu-guang^{1,2*} (1. *Shannxi College of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China*; 2. *Shaanxi Gastrointestinal Disease and Syndrome Formulae Provincial Key Laboratory, Xianyang 712046, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Wumei pill and its subdivisions on Notch signal pathway in colonic epithelial cells of ulcerative colitis (UC) rats, and explore the main therapy and drug of traditional Chinese medicine. **Method:** The ulcerative colitis model was established by giving 2, 4, 6-three nitro toluene sulfonate (TNBS) /ethanol enemas. Eighty rats were randomly divided into 8 groups: blank group (physiological saline 10 mL·kg⁻¹), model group (physiological saline 10 mL·kg⁻¹), Wumei pill group (53.2 g·kg⁻¹), cold and heat application group (36.0 g·kg⁻¹), heat group (21.32 g·kg⁻¹), cold group (14.68 g·kg⁻¹), tonic group (6.68 g·kg⁻¹) and astringent group (10.68 g·kg⁻¹). After 8 hours, all the groups were given Wumei pill or its subdivisions once a day. After 10 days, the colon tissue was collected for pathology examination and the Notch-1, Hes-1, Math-1 mRNA expressions of colonic epithelial cells of rats were tested by Real-time quantitative PCR detecting system (Q-PCR) method. **Result:** Compared with blank group, Notch-1, Hes-1 mRNA expression was significantly enhanced while Math-1 mRNA was decreased in model group rats ($P < 0.05$). Notch-1, Hes-1 mRNA expression was significantly decreased while Math-1 mRNA was enhanced in Wumei pill group and cold and heat application group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The cold and heat application group play an important role in regulating the Notch signal pathway in Wumei pill, and the therapy of cold and heat is the main method for treatment of ulcerative colitis.

[Key words] Wumei pill; ulcerative colitis; colonic epithelial cells; Notch signal pathway

[收稿日期] 20150112(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403320);陕西省教育厅项目(2013JK0824);陕西省科技厅项目(2013JQ4006)

[第一作者] 惠毅,博士,讲师,从事温病方药与治法的基础与临床研究, Tel:029-38185254, E-mail: drhy1982@126.com

[通讯作者] *闫曙光,博士,讲师,从事方剂配伍规律与辨证论治技巧研究, Tel:029-38185254, E-mail: ysg2002.student@sina.com

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以结肠上皮黏膜持续损伤为主要病理改变的难治性疾病。研究表明,肠黏膜屏障的损伤是导致结肠上皮黏膜持续损伤的主要原因,而肠上皮细胞分化失常与肠黏膜屏障损伤密切相关^[1]。Notch 信号通路具有调节肠上皮细胞分化的作用,能促进结肠黏膜屏障的修复和上皮的再生,在 UC 的发生和发展过程中起重要作用,因此 Notch 信号通路成为治疗 UC 的关键靶点。乌梅丸是《伤寒论》中治疗“久泻、久痢”的经方,临床治疗 UC 疗效确切^[2]。前期实验研究表明,乌梅丸可通过抗炎、止泻、止痛等途径对 UC 发挥治疗作用^[3-5],本文是在前期研究的基础上,进一步观察乌梅丸及拆方对 UC 大鼠结肠上皮细胞 Notch 信号通路的影响,探讨其治疗 UC 的作用机制以及寻找方中对 UC 起主要治疗作用的治法和药物。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠(西安交通大学医学院实验动物中心),雄性,体重(220 ± 20) g,合格证号 SCXK(陕)2007-001。动物饲养和实验均在陕西中医学院清洁级动物实验室进行。

1.2 药物 乌梅丸由乌梅 16 g,黄连 16 g,细辛 6 g,干姜 10 g,桂枝 6 g,附子 6 g,蜀椒 4 g,人参 6 g,当归 4 g,黄柏 6 g 组成;根据中医治法理论将该方进行拆方,寒热并用方由黄连,黄柏,干姜,桂枝,附子,蜀椒,细辛组成;温热方由干姜,桂枝,附子,蜀椒,细辛组成;苦寒方由黄连,黄柏组成;补益方由人参,当归组成;收敛方由乌梅组成(各拆方中单味药物剂量与原方剂量相同)。以上中药购于陕西中医学院第二附属医院,经陕西中医学院中药教研室鉴定合格;药物加温水浸泡,附子先煎 30 min,余常规煎煮,浓缩后备用。

1.3 试剂和仪器 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(美国 Sigma 公司,批号 0002508192),RNA 提取试剂盒,cDNA 合成试剂盒,实时荧光定量核酸扩增检测系统(Q-PCR) Super Mix(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为 I20123, H51028, H41127),引物的设计与合成(南京金斯瑞生物科技有限公司,引物序列及批号见表 1)。Nanodrop 2000 C 型核酸测定仪(Thermo 美国公司),Scientific Micro CL 17 型微量离心机(Thermo 美国公司),EDC-810 型 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司)。ACT-1 DXM1200 型图像采集系统(日本尼康公司),光学显微镜(蔡司光学仪器公司)。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers sequences

引物名称	引物序列	批号
Notch-1	上游 5'-AGCCTCGATTTTCTGCTCA-3'	C01750-05
	下游 5'-AAGTTTCCAGCCTCCTCCTC-3'	C01750-06
Hes-1	上游 5'-AGCTGGAGAAGGCAGACATT-3'	C01750-07
	下游 5'-CGTTGATCTGGGTATGCGAC-3'	C01750-08
Math-1	上游 5'-CTGAAGGGTGGGGTGTAGT-3'	C01750-09
	下游 5'-TCCGACAGAGCGTTGATGTA-3'	C01750-10
β-actin	上游 5'-TACAACCTTCTGCAGCTCC-3'	C01750-11
	下游 5'-ATCTTCATGAGGTAGTCTGTGTC-3'	C01750-12

2 方法

2.1 分组与处理 将 80 只大鼠随机分成 8 组:空白组、模型组、乌梅丸全方组、寒热并用组、温热药物组、寒凉药物组、补益药物组、收敛药物组,每组 10 只。除空白组外,其余大鼠禁食 24 h 后,4% 水合氯醛 ip 麻醉,用直径 2.0 mm 的硅胶管由肛门轻柔插入约 8 cm,将 50% 的 TNBS/乙醇溶液按 100 mg · kg⁻¹ 缓慢推入结肠(约 0.8 mL/只),诱导溃疡性结肠炎形成^[6]。造模 8 h 后开始 ig 给药,每天 1 次。根据前期实验结果,乌梅丸剂量按照全方 4 倍剂量给药。乌梅丸全方组给乌梅丸方 53.2 g · kg⁻¹(相当于原生药量);寒热并用组给寒热并用方 36.0 g · kg⁻¹;温热药物组给温热方 21.32 g · kg⁻¹;苦寒药物组给苦寒方 14.68 g · kg⁻¹;补益药物组给补益方 6.68 g · kg⁻¹;收敛药物组给收敛方 10.68 g · kg⁻¹;空白组、模型组均给予生理盐水 10 mL · kg⁻¹,给药 10 d。

2.2 结肠组织病理学观察 取 0.5 cm 结肠组织,甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色观察结肠组织变化。

2.3 结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1, Math-1 mRNA 的测定 取肛门上约 4 ~ 10 cm 间肠段,冰生理盐水清洗,刮取结肠黏膜,置于 5 mL EP 管中,加入 1 mL RNA hold,匀浆,按 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,取 2 μL 总 RNA 按照反转录试剂盒合成 cDNA, cDNA 合成体系:总 RNA 2 μL, ALL-in-one SuperMix 4 μL, gDNA Remover 1 μL, 加 RNase-free Water 定容至 20 μL,轻轻混匀,42 °C 孵育 15 min, 85 °C 加热 5 s,测定 cDNA,备用。Q-PCR 法检测 mRNA 表达, PCR 反应体系:PCR Mix 10 μL, 引物各 0.4 μL, cDNA 量根据浓度定,加灭菌蒸馏水补足至 20 μL。反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s;57 °C 退火 45 s;72 °C 延伸 40 s;40 ~ 45 个循环,72 °C 终末延伸 10 min。以 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因与内参基因

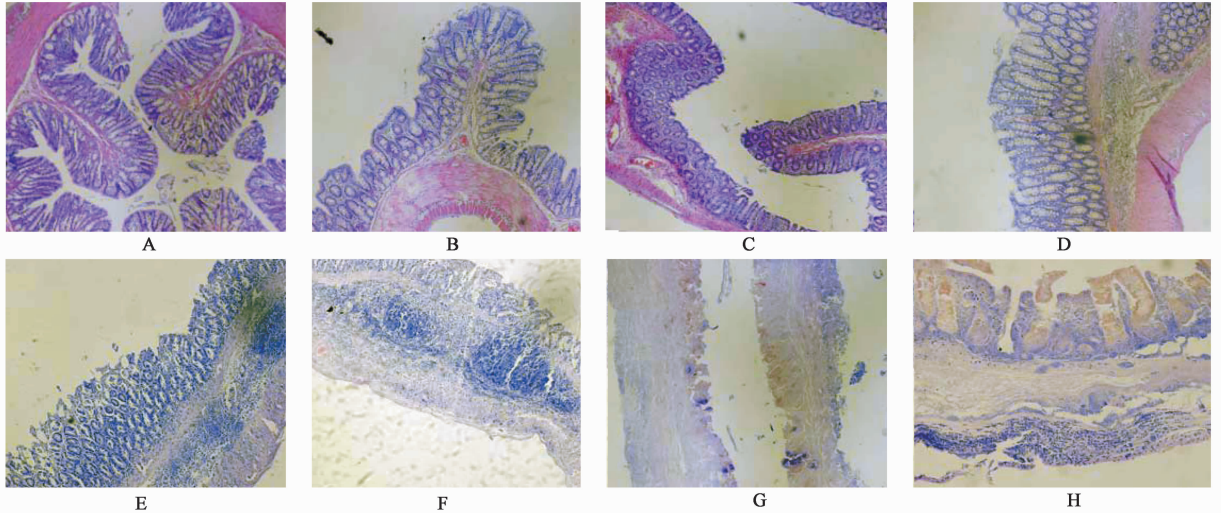
的相对定量值。

2.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 处理数据, 计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 One-WAY ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理变化的影响 空白组大鼠结肠上皮结构完整, 结肠黏膜表面光滑, 肠腺清晰, 无炎症细胞浸润。模型组大鼠结肠黏膜表面起伏不平, 可见溃疡面形成或黏膜大面积

缺损, 有大量炎症细胞浸润, 腺体萎缩或消失, 排列紊乱, 严重的损害黏膜下层, 可见黏膜下层炎症和出血。经各拆方给药治疗后, 乌梅丸全方组及寒热并用药物组结肠黏膜仍可见炎症细胞浸润, 但明显少于模型组, 黏膜缺损面明显减小, 仍可见腺体及杯状细胞; 温热药物组、寒凉药物组、补益药物组和收敛药物组仍可见大量炎症细胞浸润, 甚至达黏膜下层, 大片黏膜缺损或坏死, 表面不平, 腺体结构不完整, 杯状细胞数目明显减少甚至消失。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 乌梅丸全方 $53.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 寒热并用药物 $36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 温热药物 $21.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 寒凉药物 $14.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; G. 收敛药物 $6.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; H. 补益药物 $10.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 各组大鼠结肠病理组织学观察 (HE, $\times 50$)

Fig. 1 The different groups of rats colon pathological histology observation (HE, $\times 50$)

3.2 对溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1, Math-1 mRNA 表达的影响 模型组与空白组比较, 大鼠结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1 mRNA 表达显著增强 ($P < 0.05$), Math-1 明显减弱 ($P < 0.05$), 表明随着 Notch 信号通路的激活, Notch-1 促进下游的 Hes-1 基因的过度表达, 从而抑制了 Math-1 的表达, 使增殖的结肠上皮细胞向吸收细胞系转化, 加重肠道损伤; 给药后, 与模型组比较, 乌梅丸全方组、寒热并用药物组大鼠结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1 mRNA 表达显著减弱 ($P < 0.05$), Math-1 明显增强 ($P < 0.05$), 表明乌梅丸方和寒热并用药物组通过抑制 Notch-1 的表达, 间接抑制了 Hes-1 的表达, 促进了 Math-1 的表达, 促使增殖的结肠上皮细胞向分泌细胞系转化, 对溃疡性结肠炎起到治疗作用; 与乌梅丸全方组比较, 温热药物组、寒凉药物组大鼠结肠上皮细胞 Notch-1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 乌梅丸拆方对 UC 大鼠结肠上皮细胞 Notch-1, Hes-1, Math-1 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Wumei pill and its subdivisions in colonic epithelial cells Notch-1, Hes-1, Math-1 mRNA relative expression ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	mRNA/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$		
		Notch-1	Hes-1	Math-1
空白	-	$1.05 \pm 0.03^{2)}$	$1.07 \pm 0.03^{2)}$	$1.30 \pm 0.05^{2)}$
模型	-	1.95 ± 0.03	1.89 ± 0.05	0.83 ± 0.03
乌梅丸全方	53.20	$1.38 \pm 0.03^{2)}$	$1.44 \pm 0.04^{2)}$	$1.17 \pm 0.03^{2)}$
寒热并用	36.00	$1.42 \pm 0.04^{2)}$	$1.46 \pm 0.05^{2)}$	$1.13 \pm 0.04^{2)}$
温热药物	21.32	$1.78 \pm 0.04^{2,4,6)}$	$1.84 \pm 0.05^{4,6)}$	$0.83 \pm 0.06^{4,6)}$
寒凉药物	14.68	$1.82 \pm 0.03^{2,4,6)}$	$1.85 \pm 0.05^{4,6)}$	$0.81 \pm 0.02^{4,6)}$
收敛药物	6.68	$1.92 \pm 0.04^{4,6)}$	$1.88 \pm 0.03^{4,6)}$	$0.82 \pm 0.03^{4,6)}$
补益药物	10.68	$1.91 \pm 0.04^{4,6)}$	$1.85 \pm 0.04^{4,6)}$	$0.83 \pm 0.03^{4,6)}$

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与乌梅丸全方组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与寒热并用组比较⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

近年来研究发现, Notch 信号通路是上皮层再生过程中的决定性因素, 是调节肠道上皮细胞增殖和分化以及参与肠道上皮细胞的维护、保持肠道上皮细胞抗菌活性的关键通路, 有助于肠黏膜的修复和维护肠道内环境的稳定^[7]。Notch 信号通路的活化能决定肠道上皮细胞中分泌和吸收细胞的命运^[8], 其中 Hes-1 和 Hath1 是调节人类肠道上皮细胞分化的主要靶基因^[9], Hes-1 基因的表达能促使肠上皮细胞向吸收细胞系分化, Hath1 (与小鼠 Math-1 基因等同) 是肠上皮细胞向分泌细胞系分化的靶基因。Notch 信号通路活化后通过促使 Hes-1 在肠道上皮的细胞的表达来抑制 Hath1 的表达, 使肠上皮细胞朝着吸收细胞系分化, 对肠上皮细胞的命运起决定作用。Notch 信号通路通过促进肠上皮细胞向吸收细胞转换, 从而减少分泌细胞特别是杯状细胞的数量^[10]。杯状细胞是构成结肠上皮的主要细胞, 约占结肠上皮细胞总数的 50%, 它能产生和分泌大多数的黏蛋白 (MUC2)、大量生物活性分子如上皮膜结合蛋白、三叶因子多肽、抵抗素样因子 β 、Fc- γ 结合蛋白等, 这些物质构成了肠道的黏液层, 在肠道和上皮之间起着重要的防御作用, 使上皮细胞免受肠道内微生物的侵害^[11]。在活动性 UC 患者的损伤部位, 可以见到大量的杯状细胞丢失及其分泌的黏蛋白的减少, 造成黏液层的丢失, 扰乱了黏膜屏障的正常防御功能, 导致微生物侵入诱发炎症反应^[12]。本次研究结果表明, 乌梅丸对 Notch 信号通路有一定的调节作用, 能通过抑制 Notch-1 的过度活化, 调节 Hath-1 和 Math-1 基因之间的平衡, 从而促进增殖的结肠上皮细胞向分泌细胞系转化, 促进结肠黏膜屏障的修复和肠上皮的再生。各拆方组与全方的对比结果表明, 乌梅丸方中对 Notch 信号通路有调节作用的主要是寒热并用组药物, 这也说明寒热并用法是该方通过 Notch 信号通路治疗溃疡性结肠炎的主要治法。

[参考文献]

[1] Noah T K, Donahue B, Shroyer N F. Intestinal

development and differentiation[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(19): 2702-2710.

[2] 闫曙光, 惠毅, 周永学, 等. 乌梅丸方加减治疗溃疡性结肠炎的疗效评价与 Meta 分析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(3): 296-298.

[3] 闫曙光, 周永学, 惠毅. 乌梅丸拆方对 TNBS 诱导大鼠溃疡性结肠炎治疗作用的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(4): 890-895.

[4] 闫曙光, 惠毅, 周永学. 乌梅丸及其拆方的镇痛作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(21): 262-265.

[5] 闫曙光, 惠毅, 周永学. 乌梅丸拆方对溃疡性结肠炎大鼠结肠 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1386-1388.

[6] Min Zhang, Yin Long, Yang Sun. Evidence for the complementary and synergistic effects of the three-alkaloid combination regimen containing berberine, hypanonitine and skimmianine on the ulcerative colitis induced by tri-nitro benzene-sulfonic acid[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 651(3): 187-196.

[7] Reid G, Carey F A. Pathology of idiopathic inflammatory bowel disease[J]. *Surgery (Oxford)*, 2011, 29(8): 362-365.

[8] Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, et al. Suppression of hath1 gene expression directly regulated by Hes-1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(11): 2251-2260.

[9] Schröder N, Gossler A. Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine[J]. *Gene Exp Patterns*, 2002, 2(3): 247-250.

[10] Zecchini V, Domaschenz R, Winton D, et al. Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(14): 1686-1691.

[11] Kim Y S, Ho S B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2010, 12(5): 319-330.

[12] Gersemann M, Stange E F, Wehkamp J. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(27): 3198-3203.

[责任编辑 聂淑琴]