

枳实中活性单体环氧橙皮油素抗溃疡性结肠炎的作用

林桂梅, 张凡, 贾天柱*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:观察环氧橙皮油素对溃疡性结肠炎小鼠治疗作用。方法: BALB/C小鼠分为6组,分别为环氧橙皮油素低、中、高剂量组(80,160,320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),正常组,柳氮磺吡啶肠溶片组(520 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和葡聚糖硫酸钠(DSS)模型组。除模型组外均按0.01 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重剂量 ig 给药,正常组给予等体积的生理盐水。除正常组外各给药组在给药同时自由饮用4% DSS水溶液,连续造模10 d。观察各组药物对BALB/C小鼠疾病活动指数的影响;采用结肠损伤评分法,观察各组药物对病变肠组织的影响;ELISA法测结肠组织细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-10(IL-10)含量;Western blot法测定环氧橙皮油素对受损结肠平滑肌肌球蛋白轻链激酶(MLCK)表达水平影响。结果:与模型组比较,环氧橙皮油素中、高剂量组疾病活动指数明显降低($P < 0.05$),结肠损伤指数明显降低($P < 0.05$),环氧橙皮油素各剂量组结肠组织TNF- α 含量逐渐降低,其中高剂量组与模型组有显著差异($P < 0.05$),环氧橙皮油素各剂量组结肠组织IL-10含量逐渐升高,其中中、高剂量组与模型组均有显著差异($P < 0.05$),环氧橙皮油素各剂量组均能使受损结肠平滑肌细胞肌球蛋白轻链激酶表达量降低,中、高剂量组与模型组有显著性差异($P < 0.05$)。结论:环氧橙皮油素通过不同作用机制对溃疡性结肠炎起到治疗作用。

[关键词] 枳实; 环氧橙皮油素; 溃疡性结肠炎; 平滑肌; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0102-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140102

Effect of Epoxyauraptene from Aurantii Fructus Immaturus on Treating Ulcerative Colitis

LIN Gui-mei, ZHANG Fan, JIA Tian-zhu* (Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Province Traditional Chinese Medicine Engineering Research Center, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of epoxyauraptene from Aurantii Fructus Immaturus on ulcerative colitis (UC) in BALB/C mice. **Method:** BALB/C mice were divided into 6 groups: the normal group (normal saline), the model group (normal saline), the sulfasalazine group (520 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the low-, medium- and high-dose epoxyauraptene groups (80, 160, 320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The UC model was induced in mice by receiving 4% dextran sulphate sodium salt solution for 10 days. All mice received 0.01 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ of the corresponding medicines. Disease activity index of BALB/C mice was observed. Colonic mucosa damage repair in mice was evaluated by Colon injury scoring method. The contents of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in BALB/C mice colon tissue were determined by using ELISA. Colon smooth muscle myosin light chain kinase expression level was determined by Western blot. **Result:** Compared with the model group, the disease activity index decreased in the medium- and high-dose epoxyauraptene groups ($P < 0.05$), colonic injury index decreased, the content of TNF- α in mice tissue decreased in the high-dose epoxyauraptene group ($P < 0.05$), the level of IL-10 increased, the damaged colon smooth muscle myosin light chain kinase expression decreased in the medium- and high-dose epoxyauraptene groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Epoxyauraptene has a good effect in treating UC by various kinds of mechanisms in mice.

[Key words] Aurantii Fructus Immaturus; epoxyauraptene; ulcerative colitis; smooth muscle; cytokines

[收稿日期] 20141126(015)

[基金项目] 国家发改委行业专项项目(201107007)

[第一作者] 林桂梅,博士,讲师,从事中药炮制研究, Tel:0411-85890151, E-mail:linguimei1982@163.com

[通讯作者] *贾天柱,教授,博士生导师,从事中药炮制研究, Tel:0411-85890135, E-mail:jiatzh@126.com

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 系原因不明的大肠黏膜慢性炎症和溃疡病变, 主要累及直肠、乙状结肠黏膜。传统医学认为溃疡性结肠炎属中医“休息痢”、“泄泻”、“肠风”等范畴, 其病机主要是由于脾胃虚弱, 或饮食不节、情志失调等因素导致脾胃受损, 湿热内生, 蕴结于肠^[1]。环氧橙皮油素是从枳实麸炒品中分离得到的一个香豆素类活性单体, 在之前的实验中考察了环氧橙皮油素对正常小鼠平滑肌的影响^[2], 发现其可以抑制正常小鼠肠平滑肌的收缩, 并且枳实麸炒品主要用来治疗胃脘痞满, 脘腹胀满, 治下泻痢等中医疾病。由此入手, 实验选取了疾病活动指数、结肠损伤评分、病变组织产生细胞因子、病变组织 Western blot 实验等为指标, 重点考察环氧橙皮油素对溃疡性结肠炎的治疗作用, 进一步解析环氧橙皮油素的药理作用机制。

1 材料

1.1 动物 BALB/C 小鼠, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 由大连医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(辽)2008-0002。

1.2 药物及试剂 环氧橙皮油素实验室自制(纯度 > 98%), 柳氮磺吡啶肠溶片(上海中西三维制药有限公司, 国药准字 H31020450), 葡聚糖硫酸钠 (DSS) (美国 MP Biomedicals 公司, 批号 216011050), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白细胞介素-10 (IL-10) ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司, 批号 284506), 苯甲基磺酰氟 (PMSF, 批号 P7626), 二硫苏糖醇 (DTT, 批号 D0632), 抗 MLCK 抗体 (批号 SAB1300116), 均购自美国 Sigma 公司。

1.3 仪器 SUNRISE 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), HH-4 型数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司), TGL-16C 型离心机 (上海安亭科学仪器厂), DYY-12 型电泳仪 (北京六一仪器厂), DYCP-40C 型半干式转印槽 (北京六一仪器厂), InnovaU570 型超低温冰箱 (美国 NBS 公司), UV-1800 型紫外-可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 BALB/C 小鼠随机分为 6 组: 环氧橙皮油素低剂量组 ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 环氧橙皮油素中剂量组 ($160 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 环氧橙皮油素高剂量组 ($320 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 正常组, 柳氮磺吡啶肠溶片组 ($520 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 DSS (4%) 模型组, 每组 10 只, 除模型组外均按 $0.01 \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重剂量 *ig* 给药, 正常组给予等体积的生理盐水。除正常组外各给药组在

给药同时自由饮用 4% DSS 水溶液, 连续饮用 10 d。
2.2 疾病活动指数 (DAI) 从造模当日起每天观察小鼠一般情况, 记录小鼠体重、大便情况, 并每天验大便隐血, 进行 DAI 评分^[3-4]。见表 1。

$$\text{DAI} = (\text{体重减轻率} + \text{大便一致性} + \text{隐血或便血}) / 3$$

表 1 疾病活动指数评分标准

Table 1 Disease activity index scoring

| 分数 | 体重减轻百分率/% | 大便性状 | 隐血或便血 |
|----|-----------|------|-------|
| 0 | 无 | 正常 | 隐血阴性 |
| 1 | 1 ~ 5 | 大便松散 | 隐血阴性 |
| 2 | 5 ~ 10 | 大便松散 | 隐血阳性 |
| 3 | 10 ~ 15 | 泄泻 | 隐血阳性 |
| 4 | > 15 | 泄泻 | 便血 |

2.3 结肠损伤评分 结肠损伤评分标准: 无损伤为 0 分, 黏膜充血、水肿、未出现溃疡为 1 分, 黏膜充血、水肿、轻度糜烂、无溃疡为 2 分, 黏膜充血、水肿、中度糜烂、有单个溃疡为 3 分, 黏膜充血、水肿、高度糜烂、有多处溃疡为 4 分, 黏膜充血、水肿、重度糜烂、有 1 cm 以上溃疡为 5 分。计算各组小鼠结肠指数, 结肠指数 = 结肠质量/体重 $\times 100\%$, 以考察结肠水肿等炎症表现^[5]。结肠纵行切开, 血性内容物用 0 ~ 3 + 标准评价: 0, 无出血; 1 +, 结肠 1/3 出血; 2 +, 结肠 2/3 出血; 3 +, 整个结肠均有出血^[6-7]。

2.4 病变组织产生细胞因子的测定 断颈处死小鼠后, 迅速取出结肠组织, 冷 PBS 液洗净肠内容物, 迅速将肠管移入试管中, 剪碎肠管, 加胰酶适量, 试管反复吹打, 后置水浴锅中, 37°C 消化 5 min, 取出试管, $1500 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清。沉淀如上重复操作一次, 弃上清。沉淀中加入细胞培养液, 反复吹打, 过 $70 \mu\text{m}$ 细胞筛网, 收集滤液, $1500 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清。沉淀中再次加入细胞培养液, 重复上述操作 2 次。最终加入定量细胞培养液, 以 1.5×10^6 个/mL 密度分装到细胞培养板中, 放入 CO_2 培养箱中孵育 48 h, 然后收集培养板内培养液, 分装在 EP 管中, -20°C 冻存, 分别用 TNF- α , IL-10 双抗体 ELISA 常规检测进行结果分析。

2.5 病变组织 Western blot 实验 断颈处死小鼠后, 迅速取出结肠组织, 裂解液裂解组织蛋白, 测定受损结肠平滑肌肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 含量。每组蛋白上样量为 $20 \mu\text{g}$, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot 实验。采用 Scion 图像处理软件分析条带。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 10.0 软件, 数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对溃疡性结肠炎小鼠 DAI 的影响

与正常组比较,随着天数的增加,模型组 DAI 指数也逐渐升

高 ($P < 0.01$);与模型组比较,环氧橙皮油素高、中、低剂量组及环氮磺吡啶肠溶片组 DAI 指数明显降低,环氧橙皮油素低剂量组无显著性差异,中剂量组(第 5,6 天)和高剂量组(第 3,5,6 天)有显著差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 环氧橙皮油素对小鼠疾病活动指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of epoxyauraptin on disease activity index in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | DAI/分 | | |
|----------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 3 d | 5 d | 6 d |
| 正常 | - | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 模型 | - | 2.59 \pm 0.12 ²⁾ | 2.71 \pm 0.23 ²⁾ | 2.83 \pm 0.15 ²⁾ |
| 环氧橙皮油素 | 80 | 2.67 \pm 0.40 | 2.62 \pm 0.09 | 2.61 \pm 0.43 |
| | 160 | 2.01 \pm 0.35 | 1.86 \pm 0.23 ³⁾ | 1.79 \pm 0.06 ⁴⁾ |
| | 320 | 1.74 \pm 0.20 ³⁾ | 1.54 \pm 0.48 ⁴⁾ | 1.50 \pm 0.11 ⁴⁾ |
| 柳氮磺吡啶肠溶片 | 520 ⁵⁾ | 1.57 \pm 0.38 ⁴⁾ | 1.55 \pm 0.21 ⁴⁾ | 1.49 \pm 0.14 ²⁾ |

注:与正常组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;⁵⁾为柳氮磺吡啶肠溶片剂量单位为 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (表 3~4 同)。

3.2 对结肠黏膜损伤修复情况的影响

与正常组比较,模型组结肠指数与结肠损伤评分明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组均能明显降低结肠指数与结肠损伤评分 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 环氧橙皮油素对小鼠结肠黏膜损伤修复的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of epoxyauraptin on colonic mucosa damage repair in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 结肠指数 | 组织损伤评分 |
|----------|---|------------------------------|-------------------------------|
| | | /% | /分 |
| 正常 | - | 2.5 \pm 0.39 | 0.21 \pm 0.06 |
| 模型 | - | 2.9 \pm 0.51 ²⁾ | 3.59 \pm 0.99 ²⁾ |
| 环氧橙皮油素 | 80 | 2.8 \pm 0.28 | 3.05 \pm 0.76 ³⁾ |
| | 160 | 2.6 \pm 0.56 ³⁾ | 2.70 \pm 0.39 ⁴⁾ |
| | 320 | 2.5 \pm 0.11 ³⁾ | 2.52 \pm 0.13 ⁴⁾ |
| 柳氮磺吡啶肠溶片 | 520 ⁵⁾ | 2.4 \pm 0.87 ³⁾ | 1.81 \pm 0.54 ⁴⁾ |

3.3 对受损结肠平滑肌细胞 TNF- α , IL-10 分泌影响

与正常组比较,模型组受损结肠平滑肌细胞 TNF- α 的分泌量明显升高,IL-10 含量明显降低,说明本次实验造模成功,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,环氧橙皮油素各用药组中仅有高剂量组能明显降低 TNF- α 含量,环氧橙皮油素中、高剂量组明显升高 IL-10 的含量,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.4 对受损结肠平滑肌 MLCK 蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组 MLCK 蛋白表达水平明

表 4 环氧橙皮油素对受损结肠平滑肌细胞 TNF- α , IL-10 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of epoxyauraptin on TNF- α , IL-10 in impaired colonic smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | TNF- α | IL-10 |
|----------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ | / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 正常 | - | 93.87 \pm 27.93 | 5.08 \pm 0.59 |
| 模型 | - | 132.10 \pm 19.84 ¹⁾ | 4.70 \pm 0.52 ¹⁾ |
| 环氧橙皮油素 | 80 | 99.95 \pm 16.27 | 4.52 \pm 0.91 |
| | 160 | 99.46 \pm 8.46 | 5.25 \pm 0.60 ³⁾ |
| | 320 | 73.81 \pm 10.76 ³⁾ | 6.25 \pm 1.73 ³⁾ |
| 柳氮磺吡啶肠溶片 | 520 ⁵⁾ | 84.47 \pm 14.51 ³⁾ | 6.65 \pm 0.60 ³⁾ |

显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,环氧橙皮油素高、中剂量组明显降低 MLCK 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。由实验结果可见,环氧橙皮油素用药浓度越高,越能抑制受损结肠平滑肌细胞肌球蛋白轻链激酶表达。见图 1。

4 讨论

疾病活动指数和结肠黏膜损伤修复情况的结果显示,环氧橙皮油素低、中、高剂量组随着用药浓度的加大,结肠指数和结肠损伤评分值呈现降低趋势。由结果可见环氧橙皮油素对溃疡性结肠炎小鼠有一定治疗作用,特别是高剂量组,结肠指数和结肠损伤评分值与模型组有显著性差异。

TNF- α 可以增加肠上皮细胞细胞旁的通透性,降低肠上皮细胞屏障的跨上皮电阻,并认为这是 TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的主要原因^[7]。

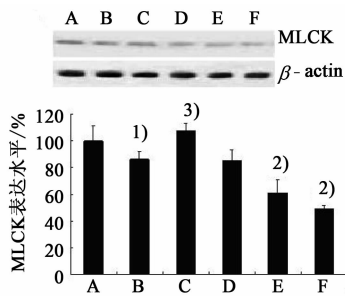


图 1 环氧橙皮油素对受损结肠平滑肌细胞肌球蛋白轻链激酶表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.1 Effects of epoxyaurapten concentrations on MLCK expression in damage smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

因此本次实验选取 TNF- α 作为考察指标,研究环氧橙皮油素对溃疡性结肠炎小鼠结肠平滑肌细胞 TNF- α 分泌量的影响。从实验结果可以看出环氧橙皮油素低、中、高剂量组随着用药浓度的增高,TNF- α 分泌量呈现下降趋势。这一结果说明环氧橙皮油素可以在一定程度上降低 TNF- α 分泌量,进而降低了 TNF- α 对体内、体外细胞凋亡的影响,而起到治疗溃疡性结肠炎的作用。从本次实验结果可以看出,环氧橙皮油素各剂量组随着用药浓度增加,IL-10 值明显升高,特别是中、高剂量组升高更为明显。有报道称内源性和外源性的 IL-10 均能在转录水平上强烈抑制肿瘤坏死因子的合成。通过环氧橙皮油素对受损结肠平滑肌细胞促炎因子 TNF- α 分泌影响实验,发现环氧橙皮油素用药浓度越高,TNF- α 值越低,而 IL-10 却越高,这有可能是 IL-10 参与了抑制 TNF- α 合成,进而导致 TNF- α 值的降低。这一结果也为进一步验证环氧橙皮油素治疗溃疡性结肠炎的作用机制奠定了一定基础。

有文献报道^[8],在 TNF- α 诱导的肠上皮细胞模型中,通过抑制 MLCK 可以调整肠道屏障功能紊乱。因此在实验中考察了环氧橙皮油素对溃疡性结肠炎小鼠平滑肌细胞 MLCK 表达量的影响。结果显示,环氧橙皮油素低、中、高剂量组都在一定程度上抑制了 MLCK 的表达,特别是中、高剂量组,抑制作用尤为明显。国内外许多研究已证实了肌球蛋白轻链激酶抑制剂可能会成为将来治疗溃疡性结肠炎的一种新方法^[9]。通过本次实验发现环氧橙皮油素也可通过抑制 MLCK 表达来治疗溃疡性结肠炎,

这一结果也为环氧橙皮油素研究开辟了一个新的空间。

通过以上实验,可以清晰的看出环氧橙皮油素对溃疡性结肠炎的治疗作用是通过多渠道,多靶点来实现的。环氧橙皮油素来源于枳实,有文献报道中草药和一些中成药对肠上皮细胞及细胞间紧密连接也具有一定的保护作用,而且副作用相对较小^[10]。是否枳实也是这类中药的一员,他对溃疡性结肠炎的影响有待于进一步探究。

[参考文献]

[1] 王立颖,徐俊林. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(1):64-67.

[2] 林桂梅,杨静娟,侯影,等. 环氧橙皮油素对平滑肌肌球蛋白功能及肌球蛋白轻链激酶表达量的影响[J]. 中成药,2012,34(10):1852-1856.

[3] 赵党生,晋梅,张磊,等. 参白合剂对实验性溃疡性结肠炎小鼠疾病活动指数及超氧化物歧化酶及丙二醛的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(4):38-39.

[4] 王桂芳,赵保胜,石宇,等. 山楂饮灌胃联合愈疡生新方灌肠对小鼠 UC 的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):193-196.

[5] 赵海梅,刘端勇,汤菲,等. 活生理肠丸治疗溃疡性结肠炎的药效学机制研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(1):169-171.

[6] 朱慧敏,朱杭溢,陈武,等. 白术水提物对溃疡性结肠炎大鼠炎症因子的影响[J]. 浙江中医杂志,2014,49(1):51-53.

[7] 崔巍,刘冬妍,马力,等. TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(16):1788-1793.

[8] Liu H, Li M, Wang P, et al. Blockade of hypoxia-inducible factor-1 α by YC-1 attenuates interferon- γ and tumor necrosis factor- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction [J]. Cytokine, 2011, 56(3):581-588.

[9] Gilbert S, Zhang R, Denson L, et al. Enterocyte STAT5 promotes mucosal wound healing via suppression of myosin light chain kinase-mediated loss of barrier function and inflammation[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(2):109-124.

[10] Miura N, Fukutake M, Yamamoto M, et al. An herbal medicine orengekuto prevents indomethacin-induced enteropathy [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(3):495-501.