

· 药理 ·

清肠化湿方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 PPAR- γ , NF- κ B 及 MUC2, TFF3 的影响

顾培青, 沈洪*, 朱磊, 刘亚军, 张露, 刘军楼, 徐艺, 成家飞
(江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察清肠化湿方对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎(UC)的治疗效果,以过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)和核因子(NF)- κ B 为中心探讨其作用机制。**方法:**将雄性 Wistar 大鼠 80 只,随机分为 8 组,分别为正常组灌胃(*ig*)生理盐水 2 mL·d⁻¹],模型组(*ig* 生理盐水 2 mL·d⁻¹),清肠化湿方低、中、高剂量组(*ig* 清肠化湿方 8,16,32 g·kg⁻¹),柳氮磺胺吡啶(SASP)组(*ig* SASP 0.67 g·kg⁻¹),SASP + 双酚 A-二甘氨酸醚(BADGE)组(*ig* SASP 0.67 g·kg⁻¹ + 腹腔注射 BADGE 20 mg·kg⁻¹)及清肠化湿方中剂量 + BADGE 组(*ig* 清肠化湿方 16 g·kg⁻¹ + 腹腔注射 BADGE 20 mg·kg⁻¹),每组 10 只。除正常组以生理盐水灌肠外,其余组采用 TNBS/乙醇灌肠造 UC 大鼠模型。以柳氮磺胺吡啶(SASP)为阳性药物,同时联合使用 PPAR- γ 抑制剂双酚 A-二甘氨酸醚(BADGE),观察大鼠疾病活动指数及结肠病理评分,蛋白质免疫印迹(Western blot)和实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法分别检测大鼠结肠组织中 PPAR- γ ,NF- κ B 的蛋白和基因表达酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肠组织分泌蛋白黏蛋白 2(MUC2)和三叶因子 3(TFF3)的表达情况。**结果:**模型组大鼠结肠出现明显炎症和溃疡,提示造模成功。模型组 PPAR- γ 蛋白和基因表达较正常组显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,清肠化湿方组和 SASP 组 PPAR- γ 表达均有所增加($P < 0.05$);联用 PPAR- γ 抑制剂 BADGE 后两组 PPAR- γ 表达又显著降低($P < 0.05$)。同时,模型组 NF- κ B 的蛋白和基因表达显著升高($P < 0.01$),清肠化湿方各剂量组均能降低 NF- κ B 的表达($P < 0.05$),而清肠化湿方中剂量 + BADGE 组较清肠化湿方中剂量组 NF- κ B 的表达又显著增高($P < 0.05$)。此外,清肠化湿方组和 SASP 组能有效升高大鼠肠组织中 MUC2 和 TFF3 的表达,而当清肠化湿方或 SASP 联合使用 BADGE 时这一作用被减弱。**结论:**清肠化湿方能有效改善溃疡性结肠炎大鼠的病变程度,其作用机制与抑制 NF- κ B 的激活,减轻炎症反应,并通过促进肠道黏膜 MUC2 与 TFF3 的分泌修复肠粘膜屏障有关,而这些作用可能主要是通过激活 PPAR- γ 信号通路完成的。

[关键词] 清肠化湿方; 溃疡性结肠炎; 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ ; 核因子- κ B; 黏蛋白 2; 三叶因子 3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0079-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030079

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161118.1317.014.html>

[网络出版时间] 2016-11-18 13:17

Effect of Qingchang Huashi Decoction on Expressions of PPAR- γ , NF- κ B p65, MUC2 and TFF3 in Colonic Mucosa of Rats with Ulcerative Colitis

GU Pei-qing, SHEN Hong*, ZHU Lei, LIU Ya-jun, ZHANG Lu, LIU Jun-lou, XU Yi, CHENG Jia-fei
(Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Qingchang Huashi decoction (QHD) on the expressions of peroxidase body growth activated receptor- γ (PPAR- γ) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 in

[收稿日期] 20160501(003)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81302919);江苏省中医药局科技项目立项计划项目(LZ13048);江苏省中医院高峰学术人才培养工程项目(k2014yrc13);江苏省中医院院级课题(Y14076)

[第一作者] 顾培青,博士,主治医师,从事炎症性肠病中医药治疗及名中医经验传承研究,Tel:025-86617141-91603,E-mail:gpqmt@163.com

[通讯作者] *沈洪,博士,主任医师,从事消化系统疾病中医药治疗及基础研究,Tel:025-86617141-91603,E-mail:shenhong999@163.com

colonic mucosa of rats with ulcerative colitis, and study the mechanism of Qingchang Huashi decoction in rats with ulcerative colitis. **Method:** Eighty male Wistar rats were divided randomly into eight groups: normal group (*ig* NS 2 mL·d⁻¹), model group (*ig* NS 2 mL·d⁻¹), QHD low-dose group, QHD medium-dose group, QHD high-dose group (*ig* QHD 8, 16, 32 g·kg⁻¹), SASP group (*ig* SASP 0.67 g·kg⁻¹), SASP + BADGE group (*ig* SASP 0.67 g·kg⁻¹ + *ip* BADGE 20 mg·kg⁻¹), and QHD medium-dose + BADGE group (*ig* QHD 16 g·kg⁻¹ + *ip* BADGE 20 mg·kg⁻¹), with 10 rats in each group. TNBS was used in all of the groups except for normal group to establish the ulcerative colitis model in rats. SASP and BADGE that is the inhibitor of PPAR- γ were used as positive control drug. The general conditions and the colonic pathology morphology were observed. Western blot and Real-time PCR were performed to detect the protein and mRNA expressions of PPAR- γ and NF- κ B p65. The expressions of mucoprotein2 (MUC2) and trefoil factor3 (TFF3) in colonic mucosa extract were detected by the method of ELISA. **Result:** Obvious inflammation and ulceration were observed in model group, which suggested that the model was successful. The protein and mRNA expressions of PPAR- γ in the model group were significantly lower than the normal group ($P < 0.01$). Compared with the normal group, expressions of PPAR- γ in QHD and SASP increased slightly ($P < 0.05$), however, these effects were reduced when QHD and SASP were combined with BADGE ($P < 0.05$). At the same time, the protein and mRNA expressions of NF- κ B p65 increased significantly in model group ($P < 0.01$). QHD could decline the expression of NF- κ B ($P < 0.05$), while QHD combined with BADGE could not inhibit its expression any more ($P < 0.05$). Moreover, SASP and QHD were able to increase the expressions of MUC2 and TFF3 in colonic mucosa, but these effects were weakened when combined with BADGE. **Conclusion:** Qingchang Huashi decoction can improve general conditions and colonic inflammation of TNBS-induced model rats. Its mechanisms may be that Qingchang Huashi decoction can activate PPAR- γ signaling pathway by inhibiting inflammation and expression of NF- κ B p65, improving secretion of MUC2 and TFF3 at mucous membrane, and restoring the intestine barrier.

[**Key words**] ulcerative colitis; Qingchang Huashi decoction; peroxisome proliferators activated receptor- γ (PPAR- γ); nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65); mucoprotein 2 (MUC2); trefoil factor 3 (TFF3)

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)。其中 UC 是一种反复发作的肠道慢性非特异性炎症性疾病, 发病机制复杂, 且病因尚未完全阐明^[1]。近年来 UC 在我国报道的病例日益增多, 据中国炎症性肠病协作组估计, 我国 UC 患病率约为 11.62/100 万, 已成为消化系统常见疾病之一^[2]。目前认为 UC 的发病机制主要与肠道免疫反应异常有关, 通过抑制免疫相关的分子通路进而阻断 UC 的炎症反应已成为研究热点^[3-4]。过氧化物酶增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 是配体激活的核转录因子超家族的一员, 包括 PPAR- α , PPAR- β/δ 和 PPAR- γ 3 种表型^[5], 在脂类代谢、炎症反应、免疫调节中起着十分重要的作用。研究表明, PPAR- γ 在结肠组织中表达较高^[6], PPAR- γ 的配体可明显减轻 UC 患者和结肠炎动物模型的炎症^[7], 临床上使用 PPAR- γ 激动剂治疗 UC 确有疗效。PPAR- γ 在 UC 的发病机制中所起的重要作用已逐步得到肯定和认可^[8]。

PPAR- γ 对各种免疫因子的抑制作用主要是通过抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的活化来完成的^[9]。NF- κ B 是 UC 炎症过程中最重要的调控因子, 可以促进多种炎性细胞因子的转录, 是治疗 UC 的关键靶位^[10]。PPAR- γ 可以在细胞水平与 NF- κ B 相互作用, 通过抑制 NF- κ B 的转录活性, 抑制 NF- κ B 的信号转导, 调控各类炎性细胞因子的表达, 从而抑制局部的炎症反应^[7]。

中医认为湿热蕴结肠络是 UC 的主要病机, 江苏省中医院清肠化湿方由刘完素治痢名方“芍药汤”化裁而来, 经国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAI04A14) 大样本、多中心、随机、对照、非劣效性研究验证, 治疗轻中度 UC 疗效可靠^[11-12], 但其具体作用机制仍有待进一步阐明。本研究以 PPAR- γ 抑制剂双酚 A-二甘氨酸醚 (BADGE) 为对照, 检测 UC 大鼠结肠黏膜中 PPAR- γ 及 NF- κ B 等的表达情况, 为进一步研究该方治疗 UC 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 80 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 (200 \pm 20) g,

由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物合格证号 SCXK(苏)2008-0001,所有动物实验研究均符合江苏省中医院伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 清肠化湿方组成为黄连 6 g,黄芩 10 g,白头翁 10 g,煨木香 10 g,炒白芍 20 g,地榆(生)10 g,肉桂 3 g,甘草(生)6 g 等(江苏省中医院药剂科提供)。2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS,美国 Sigma 公司,批号 080M5000),柳氮磺胺吡啶片(salazosulfapyridine, SASP,上海三维制药有限公司,批号 20130718),双酚 A-二甘氨酸醚(BADGE,美国 Sigma 公司,批号 065P300);一抗 PPAR- γ , NF- κ B p65(美国 CST 公司,批号分别为 03040,03012);一抗 β -肌动蛋白(β -actin)及二抗(南京诺唯赞公司,批号分别为 15031108,15020721),Sybr green(上海 Toyobo 生物科技有限公司,批号 43300),DAB 显色试剂盒(迈新试剂公司,批号 1409030031),KIT-9921 即用型免疫组化试剂盒(鼠/兔)(福州迈新生物技术开发有限公司,批号 1411249921),蛋白黏蛋白 2(MUC2)和三叶因子 3(TFF3)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(中国 Elabscience 公司,批号分别为 010324,030459),水合氯醛、无水乙醇(上海山浦化工有限公司,批号分别为 15064432,15032427)。

1.3 仪器 Mini-Protean 3 型电泳槽、半干式转膜槽(美国 Biorad 公司),5200 型化学发光凝胶成像系统(上海天能公司),LightCycler[®] 480 型荧光定量 PCR 系统(瑞士 Roche 公司),GRADIENT 型 PCR 仪(日本 Takara 公司),16131 型核酸含量测定仪(德国 Eppendorf 公司),DSX100 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 大鼠 UC 模型的制备^[7] 采用 TNBS/乙醇溶液复合法制作 UC 大鼠模型,提前 48 h 将大鼠禁食不禁水,造模当天用 10% 水合氯醛($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射(ip)麻醉;用大鼠灌胃(ig)针由大鼠肛门轻柔插入深约 8.0 cm 处一次性推入 TNBS 溶液($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TNBS 原液 + 50% 乙醇 0.25 mL),捏紧肛门提尾倒立 5 min 后,放回笼中自然苏醒,常规饲养。

2.2 分组、给药与取材 将实验动物分为 8 组,分别为正常组,模型组,清肠化湿方低、中、高剂量组, SASP 组, SASP + BADGE 组和清肠化湿方中剂量 +

BADGE 组,每组 10 只。正常组以生理盐水灌肠,其余 7 组以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TNBS 加 50% 乙醇 0.25 mL 混合试剂灌肠造大鼠溃疡性结肠炎模型。除模型组、正常组,其他组均在造模 24 h 后开始 ig 给药。大鼠给药量取人体每日剂量的 10 倍为有效剂量。中药清肠化湿方分别按高、中、低剂量组($32, 16, 8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)配成相应浓度悬浊液,按照 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药,每天 1 次。SASP 剂量为 $0.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,粉末研磨后用蒸馏水配成质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 悬浊液,按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药,每天 1 次。SASP + BADGE 组先用 SASP ig 给药(同 SASP 组),每天 1 次,然后用 BADGE $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (BADGE 1 mg 用 10% 二甲基亚砷 2 mL 溶解)ip,每天 1 次。清肠化湿方中剂量 + BADGE 组先用清肠化湿方中剂量 ig 给药(同中剂量组),每天 1 次,然后用 BADGE $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip,每天 1 次。给药 7 d 后 24 h,脱颈法处死大鼠,剖腹取全部结肠组织,均分 7 段(每段长约 1~2 cm)。

2.3 大鼠疾病活动指数及结肠组织病理学评分 根据 Murano 方法,造模后每日观察大鼠体重变化(较实验开始时体重变化百分比)、大便性状(大便是否成形)、肉眼血便情况,根据疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分标准进行评分。取各实验组大鼠距肛门端约 8 cm 处结肠组织 1 cm,10% 福尔马林溶液固定 24 h,常规脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下盲法观察,参照 Neurath 的评分标准进行病理学评分(histopathological score, HPS)。

2.4 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测各组大鼠结肠组织 PPAR- γ , NF- κ B p65 的 mRNA 表达 称取结肠组织块约 30 mg,采用经典的 Trizol 法提取总 RNA,应用核酸定量分析仪测定总 RNA 的浓度和纯度,确保 $2.0 >$ 吸光度的比值($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$) > 1.8 。参照逆转录试剂盒说明书进行逆转录,合成 cDNA,用 cDNA 模板对甘油酸-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)及 PPAR- γ , NF- κ B p65 基因分别进行 PCR 扩增,引物序列由 Oligo6.0 设计,上海生工生物工程有限公司合成,引物序列如下,内参 GAPDH (127 bp)引物序列上游 5'-GGTGTGAACCACGAGAAATATGAC-3';下游 5'-TCATGAGCCCTTCCACAATG-3'; PPAR- γ (99 bp)引物序列上游 5'-GACCTGAGCTCCAAGAATACC-3';下游 5'-TTCATGTGCCCTGTTGTAGAG-3';NF- κ B p65 (113 bp)引物序列上游 5'-GCTCAAGATCTGCCGAGTAAA-3';下游 5'-GTCCCGTGAAATACACCTCAA-3'。按 Real-time

PCR 试剂盒进行 PCR 扩增, Real-time PCR 结果判定 $\Delta C_{t_i} = C_{t_{目的基因}} - C_{t_{内参}}$, $\Delta\Delta C_{t_i} = \Delta C_{t_{处理组}} - \Delta C_{t_{正常组}}$, 相对定量法 (relative quantitation, RQ) 处理组 = $2^{-\Delta\Delta C_{t_i}}$, 其中对照组 RQ 值设为 1。以 GAPDH 为内参, 依据 $2^{-\Delta\Delta C_{t_i}}$ 法计算各 mRNA 的相对表达量。

2.5 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测 PPAR- γ , NF- κ B p65 蛋白表达 提取大鼠结肠组织蛋白质, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜, 转膜后 3% BSA 在室温下封闭 1.5 h 后, 加入合适浓度的一抗 (PPAR- γ , NF- κ Bp65 抗体工作浓度均为 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 同样方法标记 β -actin 内参抗体作为对照 (β -actin 抗体的工作浓度为 1:10 000)。孵育一抗后洗膜 3 次, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗稀释液 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 采用 HRP-ECL 发光法进行发光、显影。

2.6 大鼠结肠组织 TFF3, MUC2 含量的检测 用预冷的 PBS (0.01 mol \cdot L⁻¹, pH 7.4) 冲洗组织, 称重后剪碎, 加入玻璃匀浆器中, 于冰上充分研磨, 匀浆液于 5 000 \times g 离心 10 min, 收集上清, 分装, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。按照 ELISA 试剂盒操作步骤进行检测, 与标准品比较计算 MUC2 和 TFF3 蛋白含量的相对值。

2.7 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计分析软件 One-Way ANOVA 过程进行方差分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 最小显著差法进行两两比较, 双侧检验以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

3 结果

3.1 对 UC 大鼠 DAI 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠第 2 天即出现不同程度的摄食量减少、稀便、懒动和毛泽灰暗无光等症状, 1 周内上述症状有不同程度加重, 体重下降明显, 持续稀便, 部分大鼠有脓血便, 提示造模成功。各治疗组中, SASP 组和清肠化湿方高剂量组随着给药时间的持续, 症状改善最为明显, 大部分大鼠稀便症状消失, 基本恢复正常, 毛色逐渐转为光亮润泽, 体重增长。与模型组比较, 清肠化湿方中、低剂量组症状有所缓解, 但相对较慢 ($P < 0.05, P < 0.01$)。当中剂量清肠化湿方或 SASP 分别联合使用 PPAR- γ 抑制剂 BADGE 时, 病变程度虽略有改善, 但较单给药时显著增强 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对 UC 大鼠结肠病理评分的影响 正常组黏膜表面光滑, 上皮结构完整, 隐窝无坏死, 黏膜固有层无炎细胞浸润, 黏膜下层无充血、水肿, 无炎细胞浸润; 模型组多数黏膜层隐窝全层坏死, 表面上皮

表 1 清肠化湿方对 UC 大鼠 DAI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Qingchang Huashi decoction (QHD) on DAI in UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	DAI/分
正常	-	0.23 \pm 0.05
模型	-	2.41 \pm 0.89 ¹⁾
清肠化湿方	8	1.82 \pm 0.22
	16	1.36 \pm 0.29 ²⁾
	32	0.83 \pm 0.43 ³⁾
SASP	0.67	0.98 \pm 0.31 ²⁾
SASP + BADGE	0.67 + 0.02	1.98 \pm 0.50 ⁵⁾
清肠化湿方中剂量 + BADGE	16 + 0.02	2.37 \pm 0.29 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与清肠化湿方中剂量比较⁴⁾ $P < 0.05$; 与 SASP 组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2, 图 2~4 同)。

覆盖, 形成溃疡, 病变累及肠壁各层, 与正常组比较有统计学差异 ($P < 0.01$), 提示造模成功; 清肠化湿方清肠化湿方各剂量组和 SASP 组结肠组黏膜仍可见腺体及杯状细胞, 虽仍可见炎性细胞浸润, 但明显少于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中高剂量组和 SASP 组效果较好 ($P < 0.01$); 然而, 当清肠化湿方中剂量组或 SASP 组联合使用 BADGE 时, 溃疡病变程度显著增强, 炎性浸润增多, 与单给时比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 1。

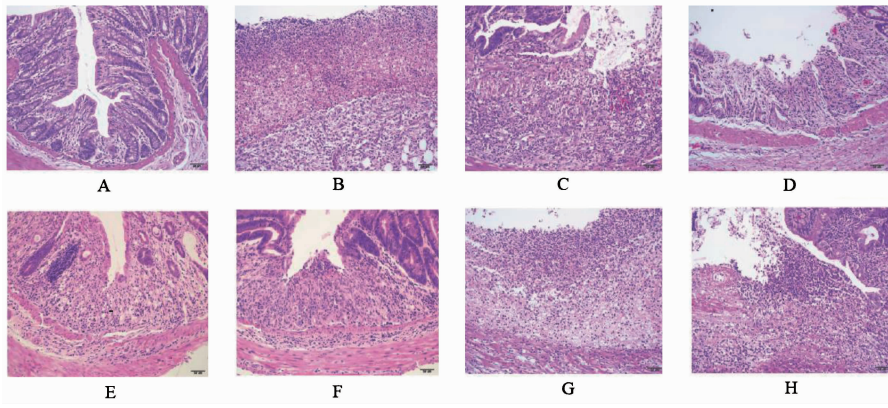
表 2 清肠化湿方对 UC 大鼠结肠病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of QHD on pathological score of colitis in UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	病理评分/分
正常	-	0
模型	-	34.44 \pm 8.82 ¹⁾
清肠化湿方	8	20.33 \pm 12.66 ²⁾
	16	14.50 \pm 10.73 ³⁾
	32	13.55 \pm 11.68 ³⁾
SASP	0.67	14.29 \pm 7.72 ³⁾
SASP + BADGE	0.67 + 0.02	25.67 \pm 15.19 ⁵⁾
清肠化湿方 + BADGE	16 + 0.02	23.43 \pm 16.52 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与清肠化湿方中剂量比较⁴⁾ $P < 0.01$; 与 SASP 组比较⁵⁾ $P < 0.01$ (图 2~4 同)。

3.3 对 UC 大鼠结肠组织 PPAR- γ , NF- κ Bp65 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠结肠组织中 PPAR- γ 的 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药清肠化湿方高、中剂量组和 SASP 组 PPAR- γ mRNA 表达明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$), 清肠化湿方组以清肠化湿方中剂量组上调 PPAR- γ mRNA 的效果更显著, 各剂量间



A. 正常组; B. 模型组; C. 清肠化湿方 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 清肠化湿方 $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 清肠化湿方 $32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. SASP 组; G. SASP + BADGE 组; H. 清肠化湿方中剂量 + BADGE 组(图 2~4 同)

图 1 清肠化湿方对 UC 大鼠结肠组织病理形态的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of QHD on pathologic morphology of colonic tissues of UC rats(HE, $\times 200$)

无剂量依赖性; BADGE 是 PPAR- γ 的有效抑制剂, 当清肠化湿方或 SASP 联合 BADGE 给药时, PPAR- γ mRNA 的表达较单给药组显著降低($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组中 NF- κ B p65 的 mRNA 表达显著上调($P < 0.01$), 中药清肠化湿方组和 SASP 组均能有效下调 NF- κ B p65 的 mRNA 表达, 其中以清肠化湿方中剂量组效果最好($P < 0.01$); 当清肠化湿方中剂量联合 BADGE 给药时, 对 NF- κ B p65 的抑制作用被逆转, 结果有统计学差异($P < 0.05$)。见图 2。

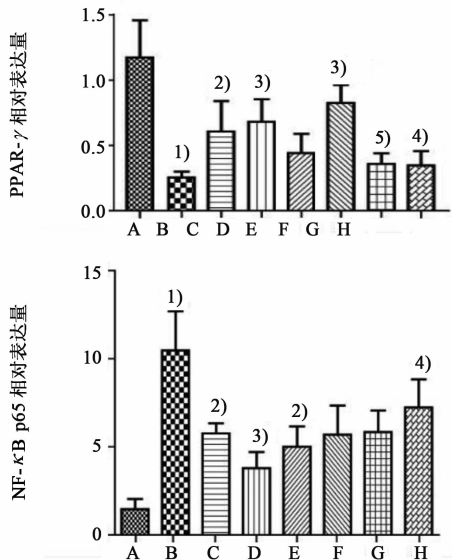


图 2 清肠化湿方对 UC 大鼠结肠组织 PPAR- γ 和 NF- κ B p65 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of QHD on expression of PPAR- γ and NF- κ B p65 mRNA in colon tissue of UC rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 对 UC 大鼠结肠组织 PPAR- γ , NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 PPAR- γ 表达下降($P < 0.01$), NF- κ B p65 表达上升($P < 0.01$);

清肠化湿方中剂量组和 SASP 组均能显著上调 PPAR- γ 表达($P < 0.01$), 当联合使用 BADGE 后, 联合组 PPAR- γ 的表达可明显被抑制($P < 0.01$); 清肠化湿方高剂量组和 SASP 组均能显著降低 NF- κ B p65 的表达($P < 0.01$); 当联合使用 BADGE 后, 联合组 NF- κ B p65 的表达明显增加($P < 0.05$)。见图 3。

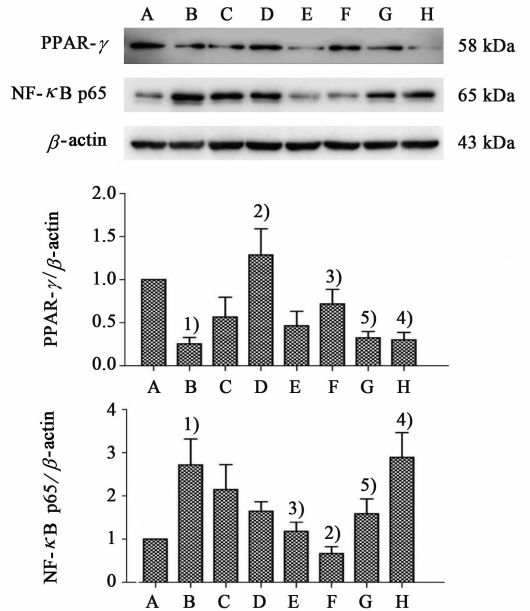


图 3 清肠化湿方对 UC 大鼠结肠组织 PPAR- γ 和 NF- κ B p65 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of QHD on expression of PPAR- γ and NF- κ B p65 protein in colon tissues of UC rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.5 对 UC 大鼠结肠黏膜分泌蛋白 MUC2, TFF3 表达的影响 与正常组比较, 模型组结肠黏膜损伤较重, 受体内修复机制作用的影响, 黏膜保护蛋白 MUC2 的表达先降低后逐渐升高($P < 0.01$)。与模

型组比较,中药清肠化湿方能剂量依赖性的上调 MUC2 的蛋白表达,且其上调作用强于 SASP 组,实验结果有统计学差异($P < 0.05$)。当清肠化湿方中剂量或 SASP 联合 BADGE 抑制 PPAR- γ 的表达后,其上调 MUC2 表达的作用消失,实验结果有统计学差异($P < 0.05$)。大鼠结肠组织中 TFF3 蛋白的表达与 MUC2 趋势相似,但实验结果没有统计学差异。见图 4。

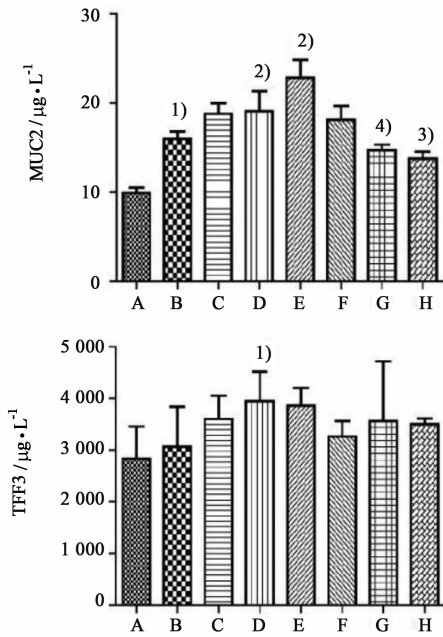


图 4 清肠化湿方对 UC 大鼠结肠组织黏膜保护蛋白 MUC2 和 TFF3 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of QHD on expression of protective protein MUC2 and TFF3 in colonic mucosa of UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

UC 是一种病因尚未完全阐明、反复发作的慢性自身免疫性疾病,已被 WHO 确定为现代难治病。临床上常采用 SASP,5-氨基水杨酸(5-ASA)抑制剂或其他免疫抑制剂治疗,但单一用药很难达到理想的治疗效果,中药方剂中不乏抗炎、止泻、黏膜保护、抑制免疫反应等多种药物,是替换治疗的重要组成部分^[2]。中医认为,UC 活动期以湿热蕴结、气血不调为主要病机。清肠化湿方由黄连、黄芩、白头翁、木香、炒白芍、地榆、白芷、肉桂、甘草(生)等组成,具有清肠化湿、调气和血、敛疮生肌之效。

本实验运用 TNBS 造大鼠急性结肠炎模型,证明了清肠化湿方能通过抑制炎症的发生发展并修复组织黏膜而有效治疗结肠炎。TNBS 诱导的 UC 模型是溃疡性结肠炎活动期的可靠模型^[13]。研究发现,模型组大鼠结肠组织中 PPAR- γ 表达降低,NF- κ B 表

达升高,中药清肠化湿方能显著上调 PPAR- γ 的表达并下调 NF- κ B 的表达。当中药清肠化湿方联合使用 PPAR- γ 的抑制剂 BADGE 时,其对 UC 的治疗效果显著下降,且下调 NF- κ B 的作用减弱。

PPAR- γ 在肠道上皮优势表达,在肠道免疫性疾病的发生和发展中起关键作用^[14]。PPAR- γ 的配体可以抑制大量促炎症基因转录因子如 NF- κ B, AP-1, STATs 等的活性,进而调控靶基因转录^[15]。其中 NF- κ B 是一种多效性的核转录因子,可以调控任何含有 κ B 位点的基因转录,包括细胞因子及其受体、黏附分子、趋化因子、促进或抑制凋亡蛋白、转录因子等。活化的 NF- κ B 可以与这些细胞因子结合并促进其大量表达,引起炎症反应,并使炎症反应放大^[16]。UC 患者病变结肠黏膜组织 NF- κ B 表达水平显著增高,并与 UC 病情活动性和严重性密切相关^[17]。研究发现,PPAR- γ 的配体抑制肠道炎症主要是通过抑制 NF- κ B 的活性完成的^[18]。

目前对清肠化湿方的实验研究发现,清肠化湿方能减少结肠黏膜 ICAM-1 的表达^[19];抑制巨噬细胞趋化,抑制白细胞介素-8(IL-8),环氧合酶-2(COX-2)的表达^[20-21];抑制肠上皮细胞半胱天冬蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达、增强 ZO-1 的表达,抑制肠黏膜组织细胞凋亡^[22];抑制结肠上皮 TLR-4 表达,降低 NF- κ B 的活化^[23]。尽管如此,对于清肠化湿方的具体作用机制仍有待进一步研究。本实验不仅证明了清肠化湿方能上调 PPAR- γ 的表达,下调 NF- κ B 的表达从而抑制溃疡性结肠炎,还通过中药清肠化湿方联合使用 PPAR- γ 抑制剂的实验,证明了清肠化湿方下调 NF- κ B 信号通路的表达是通过激活 PPAR- γ 实现的,为中药方剂的临床应用提供了理论依据。

肠黏膜的化学屏障(黏液层)对防御外来抗原物质对机体的侵袭和维持机体内环境稳定至关重要。主要由黏液细胞分泌的黏蛋白构成,MUC2 为主要成分^[24]。三叶因子(trefoil factors, TFFs)又名黏液结合肽,是近年来发现的新型生长因子,主要由 TFF1, TFF2 及 TFF3 组成。TFF3 因其抗蛋白酶的特性和对黏液糖蛋白的高亲和力,被认为在上皮细胞的重组、修复过程中发挥重要的作用^[25]。TFF3 通过与 MUC2 形成稳定的胶状复合物,可抗酸、抗蛋白酶降解和机械损伤。除此之外,TFF3 还能驱动上皮细胞迁移,快速修复损伤黏膜,因此在黏膜的保护和修复中起重要作用^[26]。前期实验显示,TNBS 建模第 3 天,结肠黏膜受损,MUC2 和 TFF3 的表达降低,

此后,受自身反馈调节的影响而逐渐升高。本文的研究表明,清肠化湿方能更进一步提高 MUC2 和 TFF3 的表达,促进结肠黏膜修复,发挥对 UC 的治疗作用。清肠化湿方联合 BADGE 的实验结果证明这一作用是受 PPAR- γ 信号通路调控的。

本文证明了清肠化湿方能有效改善 UC 大鼠的病变程度,其作用机制与激活 PPAR- γ 信号通路,抑制 NF- κ B 的激活,减轻炎症反应,并通过促进肠道黏膜 MUC2 与 TFF3 的分泌修复肠黏膜屏障,促进溃疡愈合有关。

[参考文献]

[1] Katz J A, Itoh J, Fiocchi C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 1999,15(4):291-297.

[2] 欧阳钦,胡品津,钱家鸣,等. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. *胃肠病学*, 2007, 12(8): 488-495.

[3] Loddo I, Romano C. Inflammatory bowel disease: genetics, epigenetics, and pathogenesis [J]. *Front Immunol*, 2015, 6:551.

[4] ZHANG Y Z, LI Y Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1): 91-99.

[5] Speca S, Dubuquoy L, Desreumaux P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the colon: inflammation and innate antimicrobial immunity [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48(S1): 23-27.

[6] Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases[J]. *Lancet*, 2002, 360(9343): 1410-1418.

[7] Dubuquoy L, Jansson E A, Deeb S, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(5): 1265-1276.

[8] Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, et al. PPAR-gamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases[J]. *Gut*, 2006, 55(9): 1341-1349.

[9] SU C G, WEN X, Bailey S T, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response [J]. *J Clin Invest*, 1999,104(4):383-389.

[10] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling[J]. *Cell*,2008,132(3):344-362.

[11] 沈洪,张声生,王垂杰,等. 中药分期序贯治疗轻中度溃疡性结肠炎临床观察[J]. *中华中医药杂志*,2012, 27(7):1788-1791.

[12] 沈洪,张声生,王垂杰,等. 中药分期序贯方案对轻中度溃疡性结肠炎血沉和 C 反应蛋白的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2011,31(2):101-103.

[13] Hibi T, Inoue N, Ogata H, et al. Introduction and overview: recent advances in the immunotherapy of inflammatory bowel disease[J]. *J Gastroenterol*, 2003, 38(S15):36-42.

[14] Malur A, Mccooy A J, Arce S, et al. Deletion of PPAR-gamma in alveolar macrophages is associated with a Th-1 pulmonary inflammatory response[J]. *J Immunol*,2009, 182(9): 5816-5822.

[15] DUAN S Z, Usher M G, Mortensen R M. PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009,18(2):128-133.

[16] Park M H, HONG J T. Roles of NF-kappaB in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches [J]. *Cells*, 2016, doi: 10.3390/cells5020015.

[17] WEI J, FENG J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease [J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2010, 4(2): 105-117.

[18] Bertin B, Dubuquoy L, Colombel J F, et al. PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(12): 1501-1507.

[19] 翟金海,沈洪,陈兰. 清肠化湿方对 UC 模型大鼠结肠黏膜 ICAM-1 表达的影响[J]. *时珍国医国药*,2014, 25(4): 799-801.

[20] 沈洪,刘智群,朱荃,等. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎 NF- κ B/Tolls 通路的影响及其机制[J]. *中国中西医结合杂志*,2013,33(9):1216-1220.

[21] 朱磊,沈洪,刘丽. 清肠化湿方干预治疗对溃疡性结肠炎急性活动期小鼠结肠组织黏膜修复及 COX-2 表达影响的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*,2013, 40(11):2371-2373.

[22] 吴昊,沈洪,朱磊,等. 清肠化湿方对小鼠溃疡性结肠炎模型结肠黏膜上皮细胞 Caspase-3, ZO-1 的影响[J]. *世界中西医结合杂志*,2014,9(5): 473-491.

[23] 顾培青,沈洪,刘丽,等. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠 TLR4, NF- κ Bp65 蛋白表达的影响[J]. *中国中医急症*, 2010, 19(1): 99-101.

[24] Miner-Williams W M, Moughan P J. Intestinal barrier dysfunction: implications for chronic inflammatory conditions of the bowel[J]. *Nutr Res Rev*, 2016, 29(1):1-20.

[25] Srivastava S, Kedia S, Kumar S, et al. Serum human trefoil factor 3 is a biomarker for mucosal healing in ulcerative colitis patients with minimal disease activity [J]. *J Crohns Colitis*,2015,9(7): 575-579.

[26] Taupin D, Podolsky D K. Trefoil factors: initiators of mucosal healing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2003, 4(9):721-732.

[责任编辑 周冰冰]