

# 补中益气丸对 IEC-6 细胞损伤模型 NLRP3 炎性体及相关细胞因子的影响

张文杰, 潘华新, 巫燕莉, 李燕舞\*

(广州中医药大学脾胃研究所, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**探讨补中益气丸含药血清对炎症刺激引起的大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)损伤模型中 NOD 样受体-3(NLRP3)炎性体复合物及相关细胞因子的影响。**方法:**根据中药复方血清药理学实验方法,以 IEC-6 细胞为研究对象,设立胎牛血清组、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )组、空白组、模型组、补中益气丸组、柳氮磺吡啶组。先用 10% 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)大鼠模型血清或者 TNF- $\alpha$ (质量浓度  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )刺激 IEC-6 细胞 24 h,然后加入 10% 药物血清继续培养 24 h 后,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)方法检测 IEC-6 细胞活率;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 NLRP3 炎性体的相关蛋白表达量,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清液中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和白细胞介素-18(IL-18)的含量。**结果:**与空白组比较,TNF- $\alpha$ 组及模型组均可引起 IEC-6 细胞增殖率显著下降( $P < 0.01$ ),细胞内 NLRP3 炎性体的相关蛋白表达显著增高( $P < 0.01$ ),细胞因子 IL-1 $\beta$ ,IL-18 含量显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组细胞增殖率显著增加( $P < 0.01$ ),NLRP3 炎性体复合物蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),IL-1 $\beta$ ,IL-18 分泌显著降低( $P < 0.01$ )。**结论:**补中益气丸含药血清可通过调节肠上皮细胞 NLRP3 炎性体复合物蛋白及细胞因子分泌,减轻炎症刺激引起的肠上皮细胞损伤。

**[关键词]** 含药血清; NLRP3 炎性体; 肠上皮细胞; 补中益气丸; 血清药理学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0114-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120114

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1429.044.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-24 14:29

## Effect of Buzhong Yiqi Wan on NLRP3 Inflammasome and Related Cytokines in Intestinal Epithelial Cell Injury Model

ZHANG Wen-jie, PAN Hua-xin, WU Yan-li, LI Yan-wu\*

(Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Buzhong Yiqi Wan medicated serum on NOD like receptor-3 (NLRP3) inflammasome and related cytokines in intestinal epithelial cell (IEC-6) injury model. **Method:** According to the methods of serum pharmacology of Chinese medicine, IEC-6 cells were divided into fetal bovine serum (FBS) group, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) group, blank group, model group, Buzhong Yiqi Wan group (BZYQ), and sulfasalazine group (SASP). First 10% 2, 4, 6-nitrobenzene sulfonic acid (TNBS) model serum or TNF- $\alpha$  (mass concentration of  $100 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was used to stimulate IEC-6 cells for 24 h, and then 10% drug containing serum was added for further culture for 24 h. Then cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method and the protein expression level of NLRP3 inflammasome was detected by Western blot; the interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 levels in cell culture supernatant were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** As compared with the blank group, IEC-6 cell proliferation was

**[收稿日期]** 20170105(021)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81202627)

**[第一作者]** 张文杰,在读硕士,从事中西医结合药理研究工作,Tel: 13922720416,E-mail:251760707@qq.com

**[通讯作者]** \*李燕舞,博士,副研究员,从事调理脾胃分子药理学研究工作,Tel:020-36585555,E-mail:599249557@qq.com

significantly decreased in both TNF- $\alpha$  group and model group ( $P < 0.01$ ); the protein expression levels of NLRP3 inflammasome and cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-18) levels were all increased ( $P < 0.01$ ). After administration with BZYQ medicated serum, cell proliferation rate was increased significantly, and the NLRP3 inflammasome and IL-1 $\beta$ , IL-18 levels were decreased in IEC-6 cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) as compared with model group. **Conclusion:** BZYQ medicated serum has protective effect on intestinal epithelial cell injury by down-regulating the NLRP3 inflammasome protein expression and cytokine level in injury epithelial cell.

[ **Key words** ] medicated serum; NLRP3 inflammasome; intestinal epithelial cell; Buzhong Yiqi Wan; serum pharmacology

现代医学研究表明,益气健脾类方药能改善肠道免疫功能,增强肠道屏障并调整肠道免疫炎症反应,其中经典方剂补中益气丸出自金代名医李东垣《脾胃论》,药物组成为黄芪、党参、白术、当归、升麻、柴胡、陈皮、炙甘草。临床上多用于脾胃气虚或中气下陷者,对免疫系统、消化系统以及代谢相关疾病有积极治疗作用<sup>[1-2]</sup>。NOD 样受体-3 (NOD-like receptor, NLRP3) 炎性体是一组由 NLRP3, 凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (Caspase-1) 组成的蛋白复合体,参与肠道固有免疫反应,维持肠道环境稳态,与炎症性肠病的发生密切相关<sup>[3-4]</sup>。前期研究表明,补中益气汤可改善脾虚证胃肠道黏膜结构及功能异常,恢复胃肠道黏膜异常增高的易损性,补中益气丸对溃疡性结肠炎 (UC) 有一定的治疗和预防作用,可以抑制 UC 急性期小鼠肠道 NLRP3 炎性体复合物相关蛋白的表达,减轻细胞因子白细胞介素 (IL)-1 $\beta$  和 IL-18 水平。本研究采用小鼠小肠隐窝上皮细胞 (IEC-6) 细胞为实验体系,以肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及 UC 模型血清刺激建立上皮细胞损伤模型,通过观察补中益气丸含药血清对损伤细胞中 NLRP3 炎性体及相关细胞因子的影响,进一步探讨补中益气丸对损伤肠上皮的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞株** SPF 级 SD 大鼠 24 只,雌雄各半,体重 (200  $\pm$  20) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK (粤) 2013-0034,本研究获得广州中医药大学实验动物伦理委员会批准 (编号 2016060),所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。IEC-6 细胞购自美国 ATCC 公司 (批号 58541019)。

**1.2 药物及试剂** 补中益气丸,由炙黄芪,党参,炙甘草,炒白术,当归,升麻,柴胡,陈皮,辅料为生姜、大枣组成,北京同仁堂科技发展股份有限公司生产,批号 H31020840。2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS,美

国 Sigma 公司,批号 SLBM6263V);柳氮磺吡啶肠溶片 (SASP,上海中西三维药业有限公司,批号 Z11020244);磷酸盐缓冲液 (PBS,美国 Gibco 公司,批号 8114297);全蛋白提取试剂盒及 BCA 蛋白含量检测试剂盒 (凯基生物公司,批号分别为 KGP2100, KGPBCA); Clarity Western ECL Substrate 试剂 A 及试剂 B (美国 Bio-Rad 公司,批号分别为 102030763, 102030764);兔抗 Caspase-1 抗体,山羊抗 ASC 抗体及兔抗山羊二抗 HRP (英国 Abcam 公司,批号分别为 ab181602, ab108362, ab6741);兔抗 NLRP3 抗体 (美国 Cell Signal 公司,批号 15101);山羊抗兔二抗 HRP (康为世纪公司,批号 CW0103);大鼠 IL-1 $\beta$ , IL-18 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (加拿大 Elixir 公司,批号均为 I107FC);免疫增强型细胞增殖与活性检测 (CCK-8) 试剂盒 (碧云天生物技术公司,批号 052016160523)。

**1.3 仪器** BPN-150CRH 型二氧化碳培养箱 (昆山一恒仪器公司);3K30 型低温高速离心机 (美国 Sigma 公司);DKZ 系列电热恒温震荡水浴箱 (上海一恒科技有限公司);Mini-PROTEAN 型垂直电泳仪,ChemiDocTMSRS<sup>+</sup> 成像仪,imark 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 制备血清**<sup>[5]</sup> 无菌条件下腹主动脉采血,分离血清,作为正常大鼠血清;取 SD 大鼠 6 只,禁食 24 h,乙醚麻醉,用大鼠灌胃针头从肛门插入,深入 8 cm,推入 TNBS (含 25 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> TNBS 和 50% 乙醇) 2 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>,提捏肛门,放置 5 min 即可,术后常规饲养,3 d 后无菌条件下腹主动脉采血,分离血清,为 TNBS 模型大鼠血清;前期整体动物实验表明补中益气丸 (3 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 可显著抑制 UC 小鼠模型 NLRP3 炎性体表达,因此以此浓度制备补中益气丸含药血清。SASP (0.5 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 作为阳性药物制备含药血清。连续灌胃 (10 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 给药 3 d,每天 2 次,末次给药 1 h 后,无菌条件下腹主动脉采血,分离血

清, 55 °C 灭活 30 min。

**2.2 CCK-8 比色法测定细胞增殖** 采取 5%, 10%, 20% 大鼠模型血清刺激 IEC 细胞发现, 10% 模型血清可明显抑制细胞增殖且作用适中; 不同体积浓度药物血清(0, 5%, 10%, 20%) 对 IEC 细胞生长无明显影响, 为保持血清浓度的一致性选取 10% 为药物血清体积分数进行后续实验。取对数生长期的 IEC-6 细胞, 以  $2 \times 10^3$  个/孔, 接种于 96 孔板上, 加体积分数 10% 胎牛血清的培养基常规培养, 待 24 h 细胞贴壁后, 分为以下 6 组, 分别为空白组: 10% 正常大鼠血清的 DMEM 培养 48 h, 模型组: 加入 10% TNBS 模型大鼠血清刺激 24 h 后换液, 10% 正常大鼠血清的 DMEM 培养 24 h, 补中益气丸药物血清组: 10% TNBS 模型大鼠血清刺激 24 h 后换液, 加入 10% 补中益气丸含药血清继续培养 24 h, SASP 药物血清组: 10% TNBS 模型大鼠血清刺激 24 h 后换液, 加入 10% SASP 含药血清继续培养 24 h, 每孔终体积均为 100  $\mu$ L。胎牛血清组: 加入体积分数 10% 胎牛血清的培养基常规培养 48 h; TNF- $\alpha$  组: 加入 TNF- $\alpha$ (质量浓度 100  $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 刺激 24 h, 再用 10% 胎牛血清 DMEM 培养 24 h; 上述操作完成后换成无血清的培养基 100  $\mu$ L, 每孔加入 CCK-8 10  $\mu$ L, 孵育 1 h, 450 nm 测其吸光度 A, 计算增殖率, 增殖率等于各组别 A 减去模型组 A 之后再除以模型组 A。

**2.3 细胞分组培养** 为了进行各组蛋白提取及进一步检测相关细胞因子, 进行样本制备。取对数生长期的 IEC-6 细胞, 以  $2 \times 10^6$  个/皿, 接种于 60 mm 培养皿上, 每培养皿加入 3 mL 体积分数 10% 胎牛血清的培养基常规培养, 待 24 h 细胞贴壁后, 将培养皿分成 6 组, 空白组: 10% 正常大鼠血清的 DMEM 培养 48 h, 模型组: 加入 10% TNBS 模型大鼠血清刺激 24 h 后换液, 10% 正常大鼠血清的 DMEM 培养 24 h, 补中益气丸药物血清组: 10% TNBS 模型大鼠血清刺激 24 h 后换液, 加入 10% 补中益气丸含药血清继续培养 24 h, SASP 药物血清组: 10% TNBS 模型大鼠血清刺激 24 h 后换液, 加入 10% SASP 含药血清继续培养 24 h。胎牛血清组: 加入体积分数 10% 胎牛血清的培养基常规培养, 48 h; TNF- $\alpha$  组: 加入 TNF- $\alpha$ (质量浓度 100  $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 刺激 24 h, 再用 10% 胎牛血清 DMEM 培养 24 h; 每组最终体积均为 2 mL。

**2.4 ELISA 测定相关细胞因子** 按上述分组处理后, 吸取上清液, 2 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液, 弃沉淀, 按 ELISA 试剂盒说明书进行进一步实

验操作, 完成 IL-1 $\beta$ , IL-18 的测定。

**2.5 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 NLRP3 炎性体相关蛋白的表达** 按上述细胞分组培养后, 取出细胞培养皿, 弃上清, 用 4 °C 的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次。加入培养皿 4 °C PBS 500  $\mu$ L, 用细胞刮, 将细胞刮下。用移液枪将细胞连同 PBS 转移至 1 mL 新的离心管中, 在刚刮下细胞的培养皿中再加入 4 °C PBS 500  $\mu$ L。充分清洗培养皿, 将剩余的 PBS 转移至对应的离心管中。4 °C 条件下 5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 分 2 次离心, 弃上清, 所得沉淀即为细胞。收集细胞后, BCA 法提取并测定蛋白浓度, 制备蛋白上样样品, 进行 SDS-PAGE 电泳, 经过转膜, 封闭, 一抗孵育(Caspase-1 抗体, NLRP3 抗体, ASC 抗体稀释比例分别为 1:1 000, 1:1 000, 1:2 000), 二抗孵育(1:5 000), ECL 化学发光显影, 对相关的蛋白表达进行检测。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 19 软件作单因素方差统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 IEC6 损伤模型细胞增殖率的影响** TNF- $\alpha$  对细胞增殖具有显著抑制作用( $P < 0.01$ ); TNBS 大鼠模型血清刺激后对细胞的增殖同样有抑制作用( $P < 0.01$ ), 与 TNF- $\alpha$  刺激后比较较血清刺激后对细胞增殖的影响相对较小; 补中益气丸含药血清对 TNBS 大鼠模型血清刺激细胞有显著的促进作用( $P < 0.01$ ), 细胞增殖能力有所恢复。见表 1。

表 1 补中益气丸含药血清对模型血清刺激后 IEC-6 细胞增殖率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

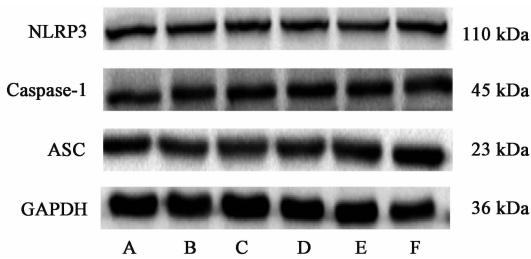
Table 1 Effect of Buzhong Yiqi Wan(BZYQ) medicated serum on IEC-6 proliferation rate after stimulated by ulcerative colitis rat serum( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	体积分数/%	A <sub>450</sub>	增殖率/%
胎牛血清	-	1.54 $\pm$ 0.10	42.59
空白	-	1.80 $\pm$ 0.14	66.67
TNF- $\alpha$	-	0.74 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>	-31.48
模型	-	1.08 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>	-
补中益气丸	10	1.79 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	65.74
SASP	10	1.94 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	79.63

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 3 同)。

**3.2 对 IEC6 损伤模型细胞中 NLRP3 炎性体蛋白表达的影响** 经 TNF- $\alpha$  及 UC 大鼠模型血清刺激后, 细胞中 NLRP3 炎性体的相关蛋白表达显著增高

( $P < 0.01$ ), 经补中益气丸含药血清干预后, 细胞中核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族成员 NLRP3, Caspase-1 及 ASC 蛋白表达量降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 2。



A. 胎牛血清组; B. 空白组; C. TNF- $\alpha$ 组; D. 模型组; E. 补中益气丸组; F. SASP 组

图 1 补中益气丸含药血清对肠上皮细胞损伤模型中 NLRP3 炎性体相关蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of BZYQ medicated serum on NLRP3 inflammasome related protein expression of injury epithelial cell model

表 2 补中益气丸含药血清对 NLRP3 炎性体相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of BZYQ medicated serum on NLRP3 inflammasome related protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	体积分数/%	NLRP3 /GAPDH	Caspase-1 /GAPDH	ASC /GAPDH
胎牛血清	-	0.19 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.03
空白	-	0.24 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.10	0.45 $\pm$ 0.05
TNF- $\alpha$	-	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.80 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.95 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>
模型	-	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.72 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.78 $\pm$ 0.19 <sup>1)</sup>
补中益气丸	10	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	0.60 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	0.70 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>
SASP	10	0.32 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.57 $\pm$ 0.02 <sup>3)</sup>	0.65 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3.3 对 IEC 损伤细胞模型分泌细胞因子的影响

在 TNF- $\alpha$  及 TNBS 模型血清的刺激下细胞分泌 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 补中益气丸含药血清能显著降低损伤细胞上清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

## 4 讨论

研究表明, 肠道固有免疫的 2 大受体家族 Toll 样受体 (TLRs) 及 NLRs 是介导肠道炎症和维持肠道稳态的关键<sup>[6-7]</sup>。NLRP3 炎性体是存在于细胞胞浆内的一类由活化的 NLRs 受体诱导装配而成的大分子多蛋白复合物, 能感知多种微生物及代谢产物激活信号<sup>[8-9]</sup>。NLRP3 炎性体是由 NLRs 家族成员 NLRP3, ASC, Caspase-1 组成, 作为固有免疫应答过程中的重要物质, 在炎症性肠病的发病过程中起到

表 3 补中益气丸含药血清对 IL-1 $\beta$  和 IL-18 表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of BZYQ medicated serum on levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	体积分数/%	IL-1 $\beta$	IL-18
胎牛血清	-	15.79 $\pm$ 0.93	5.28 $\pm$ 0.36
空白	-	31.46 $\pm$ 1.90	15.93 $\pm$ 2.04
TNF- $\alpha$	-	117.18 $\pm$ 6.08 <sup>1)</sup>	46.22 $\pm$ 2.53 <sup>1)</sup>
模型	-	92.21 $\pm$ 8.18 <sup>1)</sup>	40.07 $\pm$ 1.91 <sup>1)</sup>
补中益气丸	10	60.57 $\pm$ 1.29 <sup>2)</sup>	27.87 $\pm$ 2.64 <sup>2)</sup>
SASP	10	56.26 $\pm$ 2.39 <sup>2)</sup>	19.28 $\pm$ 1.33 <sup>2)</sup>

重要作用<sup>[10]</sup>。目前, 关于 NLRP3 炎性体在急性炎症性肠病 (IBD) 发病机制中的作用是利还是有害尚存在争议, 一方面研究显示 NLRP3 炎性体的激活被认为是诱导 IBD 炎症发生的关键及药物作用靶标, 另一方面研究发现肠道 NLRP3 炎性体信号缺陷小鼠会导致肠黏膜屏障通透性降低, 从而诱发肠道共生物引起的肠道免疫反应。本课题组前期研究表明, DSS 小鼠模型肠道急性、慢性炎症阶段 NLRP3 炎性体相关复合物蛋白表达增高, 以急性期为显著, 补中益气丸预防给药对炎性体复合物及相关细胞因子有抑制作用<sup>[11-13]</sup>。大量实验研究表明, 补中益气丸可通过影响受体和受体后细胞内信号传导和改善消化道组织结构来达到益气健脾的效果<sup>[14-15]</sup>。本实验发现, 补中益气丸含药血清可以显著减少体外炎症刺激对肠上皮细胞活率的抑制作用, 因此进一步以 NLRP3 炎性体为切入点探讨补中益气丸含药血清对肠上皮细胞损伤的保护机制。

本实验中采用的 IEC-6 细胞为小鼠小肠隐窝上皮细胞与小鼠血清亲缘性更好, 因此其增殖能力比加入相同浓度的胎牛血清更强; 同时有实验研究表明细胞培养体系中添加的血清来源的动物种数亲缘性有重要关系, 亲缘性高的血清对细胞生长有更好的促进作用, 这与本实验结果相符<sup>[16]</sup>。

TNF- $\alpha$  作为溃疡性结肠炎的致病因子, 是肠上皮细胞增殖和凋亡的促炎因子, 溃疡性结肠炎发病时, TNF- $\alpha$  分泌增加, 诱导结肠上皮细胞凋亡, 损伤肠黏膜<sup>[17]</sup>。因此本实验在细胞损伤模型的造模过程中, 选取 TNF- $\alpha$  为细胞损伤的致损剂, 进行对比。与 TNF- $\alpha$  比较, 未灭活的动物模型血清对体外培养的细胞有刺激效果, 同样可以造成细胞损伤, 抑制细胞增殖, 因此本实验选取动物模型血清对正常细胞进行刺激是可行且有效的。

随着炎性体的蛋白表达与 IEC6 细胞增殖呈负

相关性,炎性体的蛋白表达量越高,IEC6 细胞增殖活动受影响越大。Caspase-1 是 NLRP3 炎性体的效应蛋白,激活后的 NLRP3 炎性体通过活化的 Caspase-1 释放 IL-1 $\beta$  和 IL-18 参与免疫以及相关炎症反应,IL-1 $\beta$  是免疫与炎症启动的重要调节因子,细胞内产生的 IL-1 $\beta$  以前体形式存在,经过转化酶(Caspase-1)剪切形成成熟的 IL-1 $\beta$ ,分泌至细胞外,与其他炎性细胞因子协同作用。IL-18 由非活性的前体形式合成,经 IL-1 $\beta$  转化酶转化为成熟的 IL-18 而发挥生物活性,作为炎症前细胞因子,参与多种免疫性疾病的发生<sup>[18]</sup>。有研究表明,IL-1 $\beta$  和 IL-18 均可作为 UC 的临床观测指标,其表达量与患者病情的轻重成正相关<sup>[19]</sup>。通过测定 NLRP3 炎性体下游释放和激活的相关细胞因子,发现 IL-1 $\beta$  和 IL-18 表达量增加,细胞增殖能力下降。

综上所述,体外炎症刺激可引起肠上皮细胞内 NLRP3 炎性体复合物蛋白表达增高,细胞分泌 IL-1 $\beta$  和 IL-18 增多,加剧上皮细胞损伤。补中益气丸含药血清干预可明显提高受损上皮细胞的活率,可能是通过抑制肠上皮细胞 NLRP3 炎性体相关蛋白表达及相关细胞因子的分泌,进而减轻炎症刺激对肠上皮细胞的损伤作用。

#### [参考文献]

[1] 李涛,周丽梅,崔露,等. 补中益气汤活性成分筛选和寻找靶标的实例[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(13):195-201.

[2] 王敬元,刘刚. 补中益气汤加四神丸治疗溃疡性结肠炎临床观察[J]. 中医临床研究,2013,5(18):103.

[3] Zambetti L P, Mortellaro A. NLRPs, microbiota, and gut homeostasis: unravelling the connection [J]. J Pathol, 2014,233(4):321-330.

[4] Zaki M H, Boyd K L, Vogel P, et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis[J]. Immunity, 2010,32(3):379-391.

[5] 陈宁,宋冬雪,凌娜,等. 中药血清药理学方法的研究进展[J]. 北京联合大学学报,2014,28(1):40-43.

[6] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. Cell, 2006,124(4):783-801.

[7] Perera A P, Kunde D, Eri R. NLRP3 inhibitors as

potential therapeutic agents for treatment of inflammatory bowel disease [J]. Curr Pharm Des, 2017,23(46):1873.

[8] Kim J J, Jo E K. NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection[J]. J Korean Med Sci, 2013,28(10):1415-1423.

[9] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome; a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-beta[J]. Mol Cell, 2002,10(2):417-426.

[10] Sutterwala F S, Ogura Y, Zamboni D S, et al. NALP3: a key player in caspase-1 activation [J]. J Endotoxin Res, 2006,12(4):251-256.

[11] Bauer C, Duewell P, Lehr H A, et al. Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: influence of genetic and environmental factors[J]. Dig Dis, 2012,30(S1):82-90.

[12] Bauer C, Duewell P, Mayer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome [J]. Gut, 2010,59(9):1192-1199.

[13] Zaki M H, Lamkanfi M, Kanneganti T D. The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis [J]. Trends Immunol, 2011,32(4):171-179.

[14] 刘凯,王本军,马恒,等. 补中益气汤对胃癌术后气虚血瘀证胃肠功能恢复和营养状况的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(24):152-156.

[15] 李燕舞,王汝俊,王建华,等. 补脾方药对脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体及细胞内钙离子浓度的影响[J]. 中医杂志,2006,47(8):616-618.

[16] 吴健宇,穆静,李仪奎. 血清药理实验中异种动物血清对细胞的毒性作用和灭活后的减毒作用[J]. 中国药理学通报,2000,16(1):118-119.

[17] 郑海涵,吴正祥. TNF- $\alpha$  在 IBD 发病机制中的调节 [J]. 胃肠病学和肝病杂志,2011,20(2):191-193.

[18] Esper L, Utsch L, Soriani F M, et al. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during Trypanosoma cruzi infection [J]. Microbes Infect, 2014,16(6):481-490.

[19] 唐月华,王小平. 溃疡性结肠炎患者血清 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达及临床意义 [J]. 河北医药,2015,37(10):1534-1535.

[责任编辑 周冰冰]