

黄连-干姜药对预防 DSS 诱导的小鼠结肠炎作用及其机制

李阳¹, 郝艺照¹, 傅熠俊¹, 李赛美^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**研究黄连-干姜药对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎的预防作用及其机制。**方法:**将45只C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组、黄连-干姜低、中、高剂量(1.2, 2.4, 4.8 mg·kg⁻¹)组,黄连-干姜各剂量组预防性灌胃给药7 d后(正常组和模型组灌胃等量生理盐水),在继续给予相应干预的同时,模型组和中药组分别给予3% DSS水溶液自由饮用,连续饮用6 d,正常组小鼠给予自来水自由饮用。记录每日疾病活动指数(DAI),取材后测量结肠长度,苏木素-伊红(HE)染色观察结肠病理变化并记录病理组织学评分,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测小鼠血浆中白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测结肠上皮细胞中JAK2, STAT3蛋白磷酸化水平,激光共聚焦显微镜检测结肠组织中磷酸化STAT3(p-STAT3)表达水平。**结果:**模型组从第2天开始DAI较正常组均升高;黄连-干姜低剂量组DAI较模型组在第2,4,6天降低;黄连-干姜中剂量组除了第4天,均低于模型组;黄连-干姜高剂量组第2天即低于模型组,并持续至实验结束。模型组小鼠结肠长度较正常组显著缩短($P < 0.01$),黄连-干姜各个剂量组结肠长度较模型组显著增长($P < 0.05$)。结肠组织HE染色观察发现模型组炎症损伤明显较正常组严重;黄连-干姜组炎症损伤明显轻于模型组,模型组病理学评分显著高于正常组($P < 0.01$),黄连-干姜中、高剂量组病理学评分显著低于模型组($P < 0.05$)。小鼠血浆中IL-6, TNF- α 含量模型组显著高于正常组($P < 0.01$),黄连-干姜各剂量组均显著低于模型组($P < 0.01$)。结肠组织中JAK2和STAT3蛋白活化水平模型组显著高于正常组($P < 0.01$),黄连-干姜各剂量组均低于模型组($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**黄连-干姜药对可能通过抑制IL-6/STAT3信号通路从而预防DSS诱导的结肠炎症状及结肠组织炎症损伤。

[关键词] 结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 黄连-干姜药对; 预防作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0154-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150154

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0930.036.html>

[网络出版时间] 2017-05-11 9:30

Preventive Effect of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma on DSS-induced Colitis in Mice

LI Yang¹, HAO Yi-zhao¹, FU Yi-jun¹, LI Sai-mei^{2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First School of Clinic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To research the preventive effect and mechanism of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma (CRZR) in dextran sulphate sodium salt (DSS)-induced colitis model. **Method:** Totally 45 C57BL/6 mice were randomly assigned to blank control group (normal mice, $n = 9$), model group (colitis mice, $n = 9$), CRZR low dose group (1.2 mg·kg⁻¹, $n = 9$), CRZR middle dose group (2.4 mg·kg⁻¹, $n = 9$) and CRZR high dose group (4.8 mg·kg⁻¹, $n = 9$). After preventive treatment in CRZR groups by intragastric administration for 7 days (same volume of normal saline in normal group and model group), free drinking of 3% DSS solution was given in model group and Chinese medicine group for 6 days and the tap water was given in

[收稿日期] 20170313(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273740);广州市科技计划项目(20150429090459627)

[第一作者] 李阳,在读博士,从事经方治疗疑难病症研究, Tel:15521239076, E-mail:liyangebi@126.com

[通讯作者] *李赛美,博士,教授,从事经方治疗疑难病症研究, Tel:15818159018, E-mail:lisaim2004@163.com

normal group. The body weights, stool consistency, and blood in the stool were monitored every day to calculate the disease activity index (DAI). The mice were sacrificed on day 7, and the colons (from the ileocecal junction to the anal verge) were removed and the length was measured. H&E staining was used to observe the pathological changes of colon and the histopathological scores were recorded; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in plasma of mice; Western blot was used to detect JAK2 and STAT3 protein phosphorylation levels in colonic epithelial cells; and confocal laser scanning microscopy was used to detect the phosphorylated STAT3 (p-STAT3) expression level in colonic tissues. **Result:** DSS-induced model mice had an increased DAI score and decreased colon length as compared with the normal mice. CRZR low dose group had obviously lower DAI scores on day 2, 4, 6 and longer colon length as compared with the model group; CRZR middle dose group had lower DAI scores except day 4 and longer colon length as compared with the model group; CRZR high dose group had lower DAI scores from day 2 to end of the experiment and longer colon length as compared with the model group ($P < 0.05$). HE staining showed that the inflammatory injury in the model group was significantly more severe than that in the normal group, and the inflammatory injury in CRZR groups was significantly milder than that in model group; the pathological score in model group was significantly higher than that in normal group ($P < 0.01$), and the pathological scores in CRZR middle dose and high dose groups were significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). The levels of IL-6 and TNF- α in plasma of model group were significantly higher than those in normal group ($P < 0.01$), and the levels in CRZR groups were significantly lower than those in model group ($P < 0.01$). JAK2 and STAT3 protein activation levels in colonic tissues in model group were significantly higher than those in normal group ($P < 0.01$), and the levels in CRZR groups were lower than those in model group ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion:** These results indicated that CRZR may prevent DSS-induced colitis and colonic inflammation by inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway.

[Key words] colitis; dextran sulphate sodium salt (DSS); Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma; preventive effect

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)由一种肠道的慢性复发性炎症性疾病,主要包含克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC),主要症状为腹痛、腹泻、黏液便及脓血便,大约一半的严重病例需要手术治疗^[1-2]。IBD被认为是异常基因、环境、微生物、免疫和传染性因素之间相互作用的结果^[3-4]。越来越多的实验证据支持免疫紊乱为IBD发病机制的主要因素^[5]。其中,白细胞介素-6(IL-6)/JAK2/STAT3信号通路与肠道内稳态、伤口愈合反应和肿瘤的发生相关^[6],参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程,在IBD的发病过程中起着重要的作用^[7-8]。

IBD的治疗主要是使用激素或免疫抑制剂抑制非特异的免疫应答,尽管这些治疗可以减轻肠道炎症,但是副作用明显^[9],而中医药则有明显的优势。黄连-干姜药对组合是中医“寒温并用”理论的体现,也是李赛美教授在临床常用的药物组合,文献研究发现黄连和干姜单味药均对结肠炎具有治疗和预

防作用,并且应用范围广泛。但是长期单独使用黄连则偏于苦寒,常常导致很多不良反应的发生,适当配伍干姜可以抑制其寒性,对脾胃起到保护作用,使黄连能够祛邪而不伤正。但是黄连-干姜该药对配伍在结肠炎的预防方面尚无研究。

合适的肠道炎症的动物模型对于理解IBD的病理生理学机制是至关重要的^[10],其中,葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎模型是最广泛使用的模型,可以模拟人类IBD,进行免疫学和组织病理学方面的研究^[11]。所以,本研究旨在通过DSS诱导的小鼠结肠炎模型,探讨黄连-干姜预防结肠炎的作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 雄性C57BL/6小鼠45只,6周龄,体重(22±2)g,购于中山大学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2011-0029,在SPF级动物房饲养,常规喂养适应7d后。

1.2 药物及试剂 全部中药购于广州中医药大学第一附属医院,黄连(批号H3665211,产地四川)和

干姜(批号 20150801,产地四川)分别经广州中医药大学第一附属医院药剂科丘振文主任药师鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎和姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎。DSS(美国 MP biomedical 公司,批号 M2356);小鼠 IL-6,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 Ebioscience 公司,批号分别为 E09362-1656, E09483-1670);Anti-STAT3, Anti-p-STAT3 一抗(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 1452, 5230);Goat anti-rabbit IgG(美国 CST 公司,批号 7074)。

1.3 仪器 光学显微镜及激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);PerkinElmer VictorX3 型多功能酶标仪,电泳槽及凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将动物随机分为正常组、模型组、黄连-干姜低剂量($1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、黄连-干姜中剂量($2.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组和黄连-干姜高剂量($4.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 9 只。

2.2 黄连-干姜的煎煮与冻干 按 1:1 比例称取干姜、黄连共 400 g,加 8 倍量水,冷浸 1 h,煮沸回流 1 h,倾出药液,再加 7 倍量水,煮沸回流 30 min,倾出药液,合并 2 次的药液,滤纸过滤,减压浓缩,冷冻干燥,称量冻干粉质量为 31.8 g,备用。

2.3 造模方法及药物干预 黄连-干姜各个剂量组分别预防性灌胃相应剂量“黄连-干姜”水提物 7 d,正常组和模型组灌胃生理盐水,所有灌胃一直持续至实验结束。从第 8 天开始模型组和黄连-干姜各个剂量组小鼠给予 3% DSS 水溶液,棕色水瓶避光,自由饮用,每 2 d 更换 1 次,连续饮用 6 d。正常组小鼠给予自来水,自由饮用。疾病活动指数(DAI)评分被广泛用来评价结肠炎的疾病活动水平,可以将炎症程度进行量化^[12-13],每天记录小鼠体重、大便性状及便血情况,记录每 2 d 饮水量及饮水量,计算 DAI 评分:0 分为无体重变化,大便性状正常,无便血;1 分为体重变化 $-1\% \sim -5\%$,成型便软,有便血点;2 分为体重变化 $-5\% \sim -10\%$,大便有黏液、成型,成块便血;3 分为体重变化处于 $-10\% \sim -15\%$,便软、有黏液、成型,成片的便血;4 分为体重变化 $-15\% \sim -20\%$,便软、有黏液、不成型,便血及肛门肿胀。DAI = (体重变化评分 + 大便性状评分 + 便血评分)/3^[14]。

2.4 标本采集与检测 干预结束后处死各组小鼠,取整段结肠组织,量取结肠长度,冰磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净大便,沿纵轴剪开结肠,一部分结肠

用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定,另一部分结肠在冰 PBS 中刮取上皮细胞,4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清, -80°C 冻存。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色和免疫荧光

2.5.1 HE 染色检测 将固定好的组织流水冲洗过夜后,分别用以下浓度的乙醇进行脱水,70%, 80%, 90%, 95%, 95%, 100%, 100% 各 1 h,无水乙醇-二甲苯 1:1,二甲苯 I 及二甲苯 II 各 10 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 软蜡 1 h,硬蜡包埋。然后切成 4 μm 切片,脱蜡,复水,HE 染色,封片。组织学评分标准^[15],炎症严重程度,0 分为无炎症,1 分为轻微炎症,2 分为中等炎症,3 分为严重炎症;炎症范围,0 分为无炎症,1 分为炎症侵及黏膜,2 分为炎症侵及黏膜及黏膜下层,3 分为炎症透壁;隐窝破坏程度,0 分为无隐窝破坏,1 分为 1/3 隐窝破坏,2 为 2/3 隐窝破坏,3 分为隐窝消失伴上皮细胞出现,4 分为隐窝及上皮细胞均消失。

2.5.2 免疫荧光检测 结肠组织被切成 4 μm 切片,0.5% Triton X-100 透膜 30 min,5% BSA 室温封闭 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵一抗磷酸化 STAT3 (p-STAT3) (1:100)过夜,室温孵荧光偶联 PE (1:1 000) 的荧光二抗 30 min,DAPI 染细胞核 15 min,抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜检测。

2.6 ELISA 法检测小鼠血浆 IL-6 含量 取小鼠抗凝全血,4 $^{\circ}\text{C}$, 2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测。

2.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 JAK2, STAT3 活化水平 取结肠上皮细胞,加入适量裂解液、蛋白酶抑制剂和去磷酸化酶抑制剂,液氮反复冻融 3 次,超声破碎细胞,4 $^{\circ}\text{C}$, 于 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清蛋白定量后加入 loading buffer,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,80 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS-PAGE 电泳,300 mA 恒流 2 h 转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 JAK2, STAT3, p-STAT3 和 β -肌动蛋白(β -actin) (1:500), p-JAK2 ((1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗 10 min, 3 次,二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 10 min, 3 次, ECL 显色。Western blot 数据采用 Quantity one 软件对行目标蛋白条带灰度值进行定量。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件包进行统计学分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DSS 诱导的 IBD 小鼠的改善 正常组动物

在实验期间体重、粪便性状均正常,未见便血,一般状态良好;模型组动物在给予 3% DSS 造模后第 1 天出现大便稀软,第 3 天出现明显便血,部分动物大便稀溏或水样便,第 5 天部分动物出现纯血便;黄连-干姜组动物在造模后也出现大便性状的改变,便溏、血便等,但症状明显比模型组轻。与正常组比较,模型组动物 DAI 在饮用 3% DSS 后第 2 天均升

高。与模型组比较,黄连-干姜低剂量组在造模后 DAI 均降低,但仅在饮用 3% DSS 第 2,4,6 天差异才有统计学意义;黄连-干姜中剂量组,DAI 于饮用 3% DSS 后除了第 4 天,均低于模型组,并持续至实验结束;黄连-干姜高剂量组 DAI 于饮用 3% DSS 第 2 天即低于模型组,并持续至实验结束。见表 1。

表 1 黄连-干姜对 IBD 小鼠 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Effect of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma on DAI scores in IBD mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
正常	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.11	0.00 ± 0.00
模型	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.20	0.00 ± 0.00
黄连-干姜	1.2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.12	0.04 ± 0.12
	2.4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4.8	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 8 天	第 9 天	第 10 天	第 11 天	第 12 天	第 13 天	第 14 天
正常	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.17	0.07 ± 0.15	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	0.00 ± 0.00	0.58 ± 0.30 ²⁾	0.45 ± 0.31 ¹⁾	1.18 ± 0.17 ²⁾	1.09 ± 0.26 ²⁾	1.52 ± 0.50 ²⁾	2.18 ± 0.43 ²⁾
黄连-干姜	1.2	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.15 ³⁾	0.21 ± 0.35	0.50 ± 0.31 ⁴⁾	0.71 ± 0.21	0.67 ± 0.33 ⁴⁾	1.54 ± 0.53
	2.4	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.28 ⁴⁾	0.11 ± 0.17 ³⁾	0.41 ± 0.22 ⁴⁾	0.67 ± 0.69	0.52 ± 0.38 ⁴⁾	1.21 ± 0.59 ⁴⁾
	4.8	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.11 ⁴⁾	0.07 ± 0.15 ³⁾	0.33 ± 0.29 ⁴⁾	0.56 ± 0.33 ⁴⁾	0.63 ± 0.52 ⁴⁾	1.00 ± 0.60 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

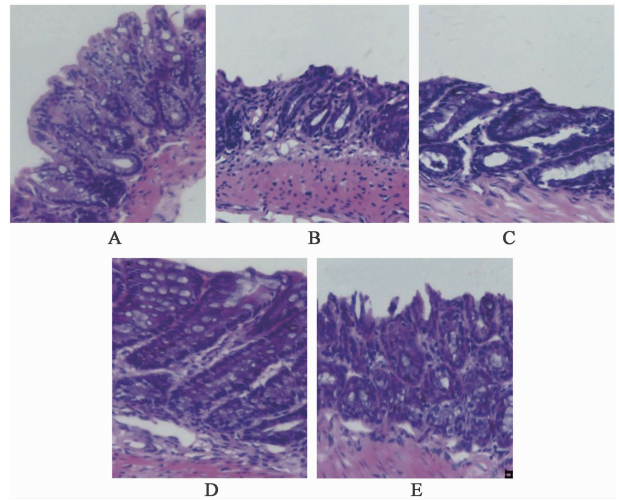
3.2 对 IBD 小鼠结肠长度和病理组织学的影响

与正常组比较,模型组小鼠结肠长度缩短 ($P < 0.01$);与模型组比较,黄连-干姜低、中剂量组结肠长度增长 ($P < 0.05$),黄连-干姜高剂量组结肠长度显著增长 ($P < 0.01$)。从 HE 染色结果可以看出,正常组小鼠结肠黏膜结构完整,肠绒毛正常,无炎症细胞浸润;模型组小鼠结肠黏膜结构不完整,肠绒毛变薄,炎症细胞浸润明显;黄连-干姜组小鼠结肠黏膜及肠绒毛结构基本与正常组相同。病理组织学评分显示:与正常组比较,模型组结肠组织病理评分显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,黄连-干姜低剂量组结肠组织病理评分无明显变化,黄连-干姜中剂量组结肠组织病理评分降低 ($P < 0.05$),黄连-干姜高剂量组结肠组织病理评分显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2,图 1。

表 2 黄连-干姜对 IBD 小鼠结肠长度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma on colon length in IBD mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	结肠长度/cm	病理评分/分
正常	-	7.38 ± 0.83	0.00 ± 0.00
模型	-	5.60 ± 0.65 ²⁾	6.33 ± 1.53 ²⁾
黄连-干姜	1.2	7.03 ± 0.66 ³⁾	4.67 ± 1.15
	2.4	7.20 ± 0.57 ³⁾	2.67 ± 0.58 ³⁾
	4.8	7.38 ± 0.88 ⁴⁾	2.00 ± 1.00 ⁴⁾



A. 正常组, B. 模型组, C. 黄连-干姜 1.2 mg·kg⁻¹ 组, D. 黄连-干姜 2.4 mg·kg⁻¹ 组, E. 黄连-干姜 4.8 mg·kg⁻¹ 组(图 2 同)

图 1 黄连-干姜对小鼠结肠组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma on colon tissue pathology in IBD mice(HE, ×400)

3.3 对 IBD 小鼠结肠组织 IL-6 和 TNF-α 含量的影响

与正常组比较,模型组血浆中 IL-6 含量显著上升 ($P < 0.01$),黄连-干姜各个剂量组血浆中 IL-6 含量较模型组均显著降低 ($P < 0.01$),且呈剂量依赖性。与正常组比较,模型组血浆中 TNF-α 含量显著上升 ($P < 0.01$),黄连-干姜各个剂量组血浆中 TNF-α 含量较模型组均显著降低 ($P < 0.01$),且呈剂

量依赖性。见表 3。

表 3 黄连-干姜对 IBD 小鼠血浆 IL-6 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 3 Effect of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma on IL-6 and TNF- α levels in IBD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-6	TNF- α
正常	-	7.11 \pm 0.10	2.12 \pm 0.07
模型	-	76.48 \pm 1.19 ²⁾	6.58 \pm 0.28 ²⁾
黄连-干姜	1.2	29.34 \pm 0.54 ⁴⁾	3.93 \pm 0.04 ⁴⁾
	2.4	14.95 \pm 0.28 ⁴⁾	3.01 \pm 0.07 ⁴⁾
	4.8	8.75 \pm 0.19 ⁴⁾	2.69 \pm 0.04 ⁴⁾

3.4 对 IBD 小鼠结肠组织 JAK2/STAT3 信号通路的影响 与正常组比较,模型组肠上皮细胞中 p-JAK2, p-STAT3 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$), 黄连-干姜各个剂量组肠上皮细胞中 p-JAK2, p-STAT3 蛋白表达较模型组降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫荧光染色结果显示,模型组肠上皮细胞中 p-STAT3 表达较正常组升高,黄连-干姜低、中、高剂量组肠上皮细胞中 p-STAT3 表达较模型组均降低,与 Western blot 结果一致。见图 2,表 4。

表 4 黄连-干姜对 IBD 小鼠结肠组织中 JAK2, STAT3 磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 4 Effect of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma on phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 in IBD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
正常	-	1.00 \pm 0.30	1.00 \pm 0.08
模型	-	4.96 \pm 1.05 ²⁾	18.65 \pm 6.25 ²⁾
黄连-干姜	1.2	2.63 \pm 0.47 ⁴⁾	5.00 \pm 0.18 ⁴⁾
	2.4	3.92 \pm 0.72 ³⁾	4.37 \pm 0.48 ⁴⁾
	4.8	2.25 \pm 0.57 ⁴⁾	5.03 \pm 0.33 ⁴⁾

4 讨论

在本研究中,笔者发现在 DSS 诱导的结肠炎模型小鼠在给予 3% DSS 后出现明显的便溏、便血症状,而给予黄连-干姜预防性干预的各组小鼠其便溏、便血症状明显减轻;综合各种症状计算其 DAI 评分,结发现 DAI 评分也显著高于正常组,给予黄连-干姜后各剂量组 DAI 评分则显著低于模型组,提示预防性给予黄连-干姜灌胃对 DSS 导致小鼠结肠炎症状体征有明显的改善作用。结肠长度的变化可以从一定程度上反映炎症进展的程度,在本实验中,模型组结肠长度明显短于正常组,黄连-干姜药对各个剂量组结肠长度均显著长于模型组,并且有明显的剂量依赖性。从 HE 染色的病理切片可以看出模

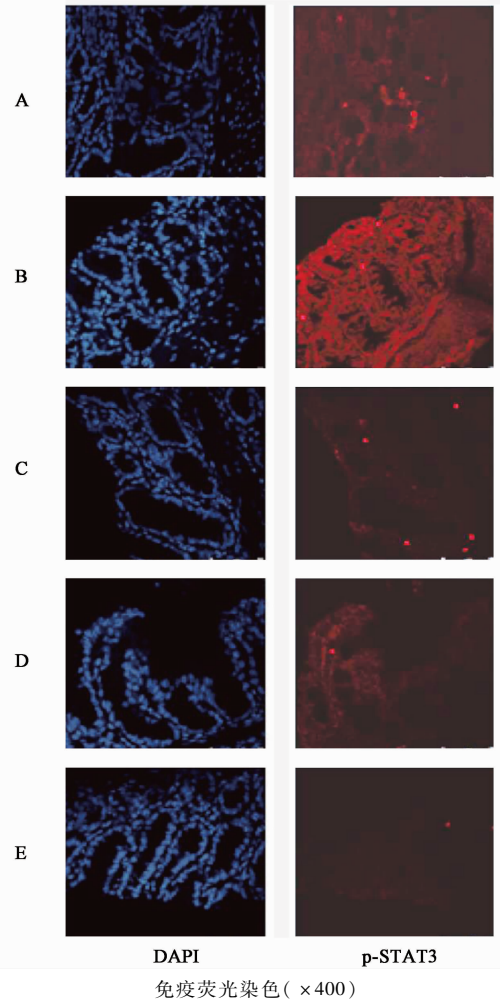
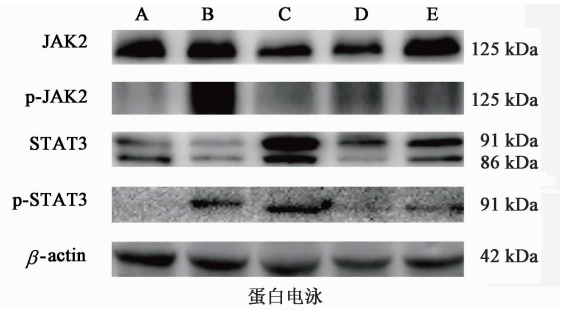


图 2 “黄连-干姜”对 IBD 小鼠结肠上皮细胞中 JAK2/STAT3 信号通路的影响

Fig. 2 Effect of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma on JAK2/STAT3 signaling pathway

型组结肠上皮绒毛明显被破坏、结构不完整以及大量炎症细胞的浸润,而给予黄连-干姜干预后这些变化被显著抑制。虽然预防性给予黄连-干姜有对 DSS 诱导的结肠炎小鼠结肠局部病理有一定的改善,但是并未使小鼠恢复到正常状态,这可能和剂量的有一定的相关性。这些结果说明预防性给予黄连-干姜可以显著改善 DSS 诱导的结肠炎症状及局部病理损伤,从而起到治疗 DSS 的作用。

IL-6 和 TNF- α 作为一种促炎因子在 IBD 的发病过程中起到了重要的促炎作用,在以往的研究中,血浆 IL-6 和 TNF- α 水平升高已经在炎症中被证实^[16-17]。在本研究中,笔者发现在 DSS 诱导的结肠炎模型小鼠的血浆中 IL-6 和 TNF- α 的含量均明显增加,而给予黄连-干姜治疗组 IL-6 和 TNF- α 的含量则明显减少。而 IL-6 分泌的增加可以激活下游的 JAK2/STAT3 信号通路,IL-6 可以通过激活 JAK 的磷酸化,进而活化 STAT3,促进肠上皮黏膜屏障的破坏,增加细菌等促炎因素侵入肠黏膜,加重炎症的发生。前期研究表明,在炎症发生过程中 STAT3 信号通路会被异常的活化^[18-19]。同时,在 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型中,IL-6 和 STAT3 的表达均显著增高,其表达随病变程度的增加而增加,在一定程度上反映了病情的严重程度^[20]。因此,IL-6/STAT3 通路的活化与结肠炎的发病密切相关^[21]。在本研究中,随着血浆中 IL-6 水平的明显上升,JAK2, STAT3 蛋白的磷酸化水平也升高,提示结肠炎模型的成立。预防性给予黄连-干姜药对可以明显地抑制 JAK2, STAT3 的磷酸化,提示预防性给予黄连-干姜可能通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路从而起到治疗作用。

综上所述,预防性给予黄连-干姜可以显著抑制 DSS 诱导的结肠炎症状和局部的病理损伤,其作用机制可能与抑制 IL-6/STAT3 信号通路有关,黄连-干姜可能作为 IBD 的一种有效的预防药物。

【参考文献】

[1] Baumgart D C, Sandborn W J. Crohn's disease [J]. Lancet, 2012, 380 (9853) : 1590-1605.
[2] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2012, 380 (9853) : 1606-1619.
[3] Endo K, Shiga H, Kinouchi Y, et al. Inflammatory bowel disease: IBD [J]. Rinsho Byori, 2009, 57 (6) : 527-532.
[4] Matricon J. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Med Sci, 2010, 26 (4) : 405-410.
[5] Yamamoto-Furusho J K, Podolsky D K. Innate immunity in inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (42) : 5577-5580.
[6] Jarnicki A, Putoczki T, Ernst M. Stat3: linking inflammation to epithelial cancer more than a "gut" feeling? [J]. Cell Div, 2010, 5 (12) : 14.
[7] Atreya R, Neurath M F. Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer [J]. Curr Drug Targets, 2008, 9 (5) : 369-374.
[8] Mitsuyama K, Matsumoto S, Masuda J, et al. Therapeutic strategies for targeting the IL-6/STAT3 cytokine signaling pathway in inflammatory bowel disease

[J]. Anticancer Res, 2007, 27 (6A) : 3749-3756.
[9] Isaacs K L, Lewis J D, Sandborn W J, et al. State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD [J]. Inflamm Bowel Dis, 2005, 11 (Suppl 1) : 3-12.
[10] Wirzl S, Neufert C, Weigann B, et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation [J]. Nat Protoc, 2007, 2 (3) : 541-546.
[11] Chassaing B, Aitken J D, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS) -induced colitis in mice [J]. Curr Protoc Immunol, 2014, 5 (2) : 104.
[12] Maunder R G, Greenberg G R. Comparison of a disease activity index and patients' self-reported symptom severity in ulcerative colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2004, 10 (5) : 632-636.
[13] Holtmann M H, Krummenauer F, Claas C, et al. Significant differences between Crohn's disease and ulcerative colitis regarding the impact of body mass index and initial disease activity on responsiveness to azathioprine: results from a European multicenter study in 1, 176 patients [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55 (4) : 1066-1078.
[14] Alex P, Zachos N C, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15 (3) : 341-352.
[15] Andújar I, Recio M C, Giner R M, et al. Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59 (12) : 6474-6483.
[16] Mudter J, Neurath M F. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance [J]. Inflamm Bowel Dis, 2007, 13 (8) : 1016-1023.
[17] LI Y, YU C, ZHU W M, et al. Triptolide ameliorates IL-10-deficient mice colitis by mechanisms suppression of IL-6/STAT3 signaling pathway and downregulation of IL-17 [J]. Mol Immunol, 2010, 47 (15) : 2467-2474.
[18] Mudter J, Neurath M F. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance [J]. Bowel Dis, 2007, 13 (8) : 1016-1023.
[19] LI Y, YU C, ZHU W M, et al. Triptolide ameliorates IL-10-deficient mice colitis by mechanisms suppression of IL-6/STAT3 signaling pathway and downregulation of IL-17 [J]. Mol Immunol, 2010, 47 (15) : 2467-2474.
[20] CHEN Y Y, MA Z B, XU H Y, et al. IL-6/STAT3/SOCS3 signaling pathway playing a regulatory role in ulcerative colitis carcinogenesis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (8) : 12009-12017.
[21] Zundler S, Neurath M F. Integrating immunologic signaling networks: the JAK /STAT pathway in colitis and colitis-associated cancer [J]. Vaccines: Basel, 2016, doi: 10.3390 /vaccines4010005.

【责任编辑 周冰冰】