

## 肾蕨对乙酸致小鼠肛门溃疡的作用及 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和 COX-2 表达的影响

王小青, 高杨, 马帅, 商亚珍\*

(承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000)

**[摘要]** **目的:**研究肾蕨叶水提取物(NLD)对小鼠肛门溃疡模型的作用及机制。**方法:**以 20% 乙酸(HAc)0.5 mL 涂抹小鼠肛门,制备肛门溃疡模型,将 50 只昆明小鼠随机分为正常组、模型组、NLD 低、中、高剂量(0.45, 0.9, 1.8 g·kg<sup>-1</sup>)组,每组 10 只。各组小鼠自外涂给 NLD 计时,第 10 天处死。采集肛门、直肠组织,实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组小鼠肛门、直肠组织中核转录因子(NF)- $\kappa$ B, 肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ , 白细胞介素(IL)-1 $\beta$  和环氧合酶(COX)-2 mRNA 表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠肛门、直肠组织中 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 蛋白表达;苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肛门、直肠组织形态学变化。**结果:**NLD 可恢复小鼠体质量增长趋势,降低小鼠肛门脏器指数,下调小鼠肛门、直肠组织中 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 mRNA ( $P < 0.01$ ),降低小鼠肛门、直肠组织中 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 蛋白表达( $P < 0.01$ );NLD 0.9, 1.8 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组可抑制炎性细胞的浸润及黏膜下层血管扩张,改善相应炎症反应。**结论:**NLD 对肛门溃疡模型小鼠的肛门溃疡有明显的改善作用,其机制可能与下调 NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白的表达,进而下调其下游因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  与 COX-2 的基因表达有关。

**[关键词]** 肾蕨叶水提取物; 溃疡; 核转录因子- $\kappa$ B p65; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 环氧合酶-2

**[中图分类号]** R285.5;R22;R24;R266 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0122-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180738

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180111.0900.009.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-11 17:20

### Effect of *Nephrolepis cordifolia* on Acetic Acid-induced Anal Ulceration in Mice and Levels of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and COX-2

WANG Xiao-qing, GAO Yang, MA Shuai, SHANG Ya-zhen\*

(Hebei Key Laboratory of Research and Development for Traditional Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic effect of *Nephrolepis cordifolia* leaf decoction (NLD) on anal ulcer model in mice and explore its mechanism. **Method:** The anal ulcer model was prepared by applying 0.5 mL of 20% acetic acid (HAc) into the anus of mice. The 50 Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, low, middle and high dose NLD (0.45, 0.9 and 1.8 g·kg<sup>-1</sup>) groups, 10 mice in each group. All the mice were killed on the 10<sup>th</sup> day after NLD application. Their anal and rectal tissues were collected and the mRNA expression levels of nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the anal and rectal tissues of each group were detected by Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time

**[收稿日期]** 20171102(002)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局项目(2017191);河北省高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4号);承德医学院课题项目(201529);承德医学院大学生创业训练计划项目(201717)

**[第一作者]** 王小青, 硕士, 助理研究员, 从事中药药效与分子药理研究, Tel:0314-2290474, E-mail:1024107818@qq.com

**[通信作者]** \* 商亚珍, 博士, 教授, 从事中药抗老年性痴呆研究, Tel:0314-2290616, E-mail:973358769@qq.com

PCR). Western blot was used to detect the protein expression levels of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2 in anal and rectal tissues of mice in each group. Morphological changes of anal and rectal tissues in mice were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** NLD could restore the growth of mice body mass, reduce the rectoanal coefficient and down-regulate NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2 mRNA expression in the anal and rectal tissues of mice ( $P < 0.01$ ), inhibit the activity of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2 protein expression in the anal and rectal tissues of mice ( $P < 0.01$ ). NLD 0.9 and 1.8 g·kg<sup>-1</sup> could inhibit the infiltration of inflammatory cells and submucosa vasodilation and improve the corresponding inflammatory response. **Conclusion:** NLD has protective effect on the inflammatory response of acetic acid-induced anal ulcer in mice, and the mechanism may be related to inhibiting NF- $\kappa$ B mRNA and protein expression and down-regulating the gene expression of downstream inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2.

[Key words] *Nephrolepis cordifolia* leaf decoction (NLD); ulcer; nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) p65; tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ); interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ); cyclooxygenase-2 (COX-2)

痔的病理特征是肛垫病理性肥大、移位及肛周皮下血管丛血流瘀滞形成的局部肿块,痔急性发作常表现为黏膜糜烂、疼痛、便血、红肿、渗出等,并伴有病变部位的感染<sup>[1]</sup>。研究发现创伤或炎症性因素可使各种细胞因子表达和活性增强,造成微血管壁及内皮细胞的损伤<sup>[2]</sup>,不仅导致痔血管生成继续增加,还导致痔出血、水肿、脱出等临床症状,而增大和脱出的痔更易于发生创伤和炎症,从而形成痔发病中的恶性循环,因此,促溃疡愈合就成为痔疮药开发首要解决的问题<sup>[3]</sup>。另外,研究发现,痔与体内的炎症反应有关<sup>[4]</sup>,李汉隆等<sup>[5]</sup>研究发现痔术后患者血清中的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)显著下降,徐伟等<sup>[6]</sup>发现塞来昔布可降低痔术后血清中环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)的水平,由此可见,痔的发生与核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  与 COX-2 等因子密切相关<sup>[7]</sup>。

肾蕨为骨碎补科植物肾蕨 *Nephrolepis cordifolia* 的全草或块茎,为传统民间中药<sup>[8]</sup>,具有清热利湿,软坚消积功效,主治痢疾,急性肠炎,泌尿系感染,乳腺炎,淋巴结炎,睾丸炎,中耳炎,疝,疔,多发性脓肿等<sup>[9]</sup>。肾蕨主要含有黄酮类、多糖、生物碱、红杉醇和 $\beta$ -谷甾醇等多种化学成分<sup>[10-12]</sup>,具有良好的抗菌、抗氧化、降糖以及抗肿瘤活性<sup>[13-14]</sup>。承德地区民众常取其新鲜叶煎水熏洗治疗痔,且疗效显著,但未见肾蕨治疗痔的报道。

由于动物与人在生理、解剖等方面存在差异,目前没有完全符合的痔动物模型,乙酸致溃疡模型只能看作是近似模型,可致肛门组织肿胀、渗出、产生溃疡,该模型主要用于痔疮外用药物评价的研

究<sup>[15]</sup>。本研究制备小鼠肛门溃疡模型,利用组织形态学,实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 等实验技术,通过肾蕨叶水提取物 (*N. cordifolia* leaf decoction, NLD) 干预治疗,观察小鼠肛门、直肠组织病理学变化,以及 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 mRNA 与蛋白表达变化,研究肾蕨对小鼠肛门溃疡的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康清洁级雄性昆明小鼠 50 只,4 ~ 6 周龄,体质量 18 ~ 22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK (京) 2012-0001,动物实验的开展经过承德医学院实验动物福利伦理委员会审核,批准号 CDMULAC-2016-015。适应性喂养 1 周,自由饮食,12 h/12 h 暗/照交替。

**1.2 药材** 肾蕨药材,经河北省承德医学院中药研究所赵春颖教授鉴定为骨碎补科植物肾蕨 *N. cordifolia* 的全草,批号 20161211,购自玉林市鑫鸿原生中草药种植有限公司。

**1.3 试剂** 兔抗鼠一抗 NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 (美国 Bioworld 公司,批号分别为 CN54161, CC36131, CN53182, AA54141); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 109525); RIPA 组织 (细胞) 裂解液, DEPC (北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20160928, 20141223); BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天生物技术研究所,批号 20160826); ECL 超敏发光液试剂盒 (北京普利来基因技术有限公司,批号 ZD310-6AC04D); 预染蛋白 marker, trizol (美国 Thermo 公司,批号分别为 00389282, 108304); PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒 (Takara 公

司,批号分别为 AK4401,AKA403);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其他试剂购自试剂公司。

**1.4 仪器** Nikon 80i 型正置显微镜(日本尼康公司);WD-9405D 型脱色摇床,DYY-7C 型电泳仪及转模仪(北京市六一仪器厂);Thermo Excelsior Es 型自动脱水机(美国 Thermo 公司);ABI 7300 型 Real-time PCR System(美国 ABI 公司);DU800 型紫外可见分光光度计(美国 Ckman Coulter 公司);2K15 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);9602A 型全自动酶标仪(北京普朗新技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模与分组** 昆明种小鼠 50 只,随机取 10 只作为正常组,其余按照参考文献[15]造模,每天 1 次,共 3 d。并按照文献[16]及预实验结果拟定局部症状四级评分标准(表 1),分值在 4 分以上确定造模成功,将造模成功 40 只小鼠局部症状程度分层随机分为 4 组,模型组(Model),NLD 低、中、高剂量组。

表 1 局部症状四级评分标准

Table 1 Local symptom level 4 scoring criteria

症状	1 分	2 分	3 分
红肿	勉强可见	边缘高出皮肤	≥1 mm,并超过溃疡面
炎性渗出	有炎性渗出	少量炎性渗出	炎性渗出多
溃疡	≤10 mm <sup>2</sup>	20~30 mm <sup>2</sup>	≥30 mm <sup>2</sup>

注:0 分时未出现上述 3 种症状。

**2.2 药物制备** 称取新鲜肾蕨叶,浸泡于水中过夜,冷凝回流,提取 3 次,分别 3,2,1 h,合并滤液并浓缩,得 NLD 干浸膏,4 °C 保存备用。给药前称取适量 NLD,加蒸馏水稀释成含药量分别为 0.45,0.9 和 1.8 g·kg<sup>-1</sup>的溶液。

**2.3 给药**<sup>[15]</sup> 模型制备成功记为第 0 天,从第 1 天开始给予各组小鼠涂抹 NLD(直径 5 mm)治疗,依据体表面积换算法,NLD 低、中、高剂量组分别为 0.45,0.9,1.8 g·kg<sup>-1</sup>,正常组及模型组以等体积生理盐水,每天 2 次,每次 30 min 后洗去,间隔 4 h,连续给药 9 d。

**2.4 标本采集与处理** 分别在造模前,给药 9 d 后测定小鼠体质量,计算小鼠体质量均值<sup>[17]</sup>。给药结束后禁食 12 h,4% 的水合氯醛麻醉,小鼠处死后取肛门直肠组织 20 mm,生理盐水清洗后滤纸吸干并称质量,并计算脏器指数[脏器指数 = 组织湿质量(mg)/体质量(g)]<sup>[18]</sup>。一部分于 10% 甲醛溶液中固定,脱水前用自来水冲洗过夜,全自动脱水机各级

乙醇脱水,二甲苯透明,2 次浸蜡,常规石蜡包埋,轮转式切片机制片 5 μm,苏木素-伊红(HE)染色,切片以二甲苯透明,中性树胶封片,镜检;另一部分置于 -80 °C 超低温冰柜中备用。

**2.5 Real-time PCR 检测小鼠肛门、直肠组织 NF-κB, TNF-α, IL-1β 和 COX-2 mRNA 表达** 取肛门、直肠组织(100~150 mg),加 trizol 震荡离心,取上清,加 trizol 1/5 体积三氯甲烷震荡离心,取上清,加入等体积异丙醇,冰上静置 10 min 后离心,用 75% 乙醇的 DEPC 溶液清洗沉淀并干燥,将沉淀溶于 DEPC 水 200 μL,酶标仪测定 RNA 浓度,根据 Takara RT-PCR 试剂盒推荐操作将总 RNA 反转录成 cDNA,4 °C 保存。以 cDNA 为模板进行扩增 NF-κB, TNF-α, IL-1β 和 COX-2 mRNA 的基因编码片段,管家基因选择 β-actin。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 40 s,68 °C 延伸 45 s,设置 40 个循环,同时做熔解曲线。实验数据采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法进行计算,PCR 引物序列见表 2。

表 2 引物序列和产物大小

Table 2 Primer sequence and product size of gene

引物	序列(5'-3')	长度/bp
NF-κB	上游 TCCGCTATGTGTGTAAGGC	95
	下游 GTTGCAAATTTTGACCTGTGGGT	
TNF-α	上游 GAACTCCAGCGCGTGCCTAT	176
	下游 GGTGGTTTGTGACTGTGAGGGT	
IL-1β	上游 TGAAATGCCACCTTTTGACAGTGAT	162
	下游 GCCTGCCTGAAGCTCTTGTG	
COX-2	上游 CAACACCTGAGCGGTTACCA	90
	下游 AGAGGCAATGCGGTTCTGAT	
β-actin	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150
	下游 GACTCATCGTACTCTGCTTCTG	

**2.6 Western blot 检测小鼠肛门、直肠组织 NF-κB p65, TNF-α, IL-1β 和 COX-2 蛋白表达** 取肛门直肠组织(100~150 mg),加 RIPA 裂解液,离心,取上清,BCA 法测定样品蛋白浓度。样品与上样 5 × buffer 混匀,95 °C 加热使蛋白变性。根据测定的蛋白浓度每孔上样 20 μg,12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,转到 PVDF 膜上。加入一抗(1:500),4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,二抗(1:5 000)孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,ECL 发光,暗室显影,胶片扫描后,采用 Quantity One 软件对显影条带进行分析,计算 NF-

$\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 条带与  $\beta$ -actin 条带的灰度值比值,即为蛋白相对表达量。

**2.7 统计学处理** 利用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计学分析, GraphPad prism 5.0 作图, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多样本均数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 NLD 对肛门溃疡小鼠行为及局部症状的影响

肛门溃疡模型小鼠, 饮食量明显减少, 毛色暗淡, 且小鼠的活动减少, 肛门部位均出现 10 ~ 25 mm<sup>2</sup> 的溃疡面, 伴有红肿、炎性渗出。用药后各组小鼠饮食情况、毛色光泽度、精神状态、活动情况均有明显地改善, 肛门部位溃疡面明显愈合, 结痂, 红肿和炎性渗出减少。

**3.2 小鼠体质量变化及肛门、直肠脏器指数** 与正常组比较, 模型小鼠体质量增长明显减缓; 与模型组比较, 给药 9 d 后, NLD 表现出提高模型小鼠体质量增长的趋势。与正常组比较, 模型组脏器质量显著增加 ( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, NLD 0.45, 0.9, 1.8 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组脏器指数出现不同程度的降低 ( $P < 0.01$ ), 呈现一定的剂量依赖性。见表 3。

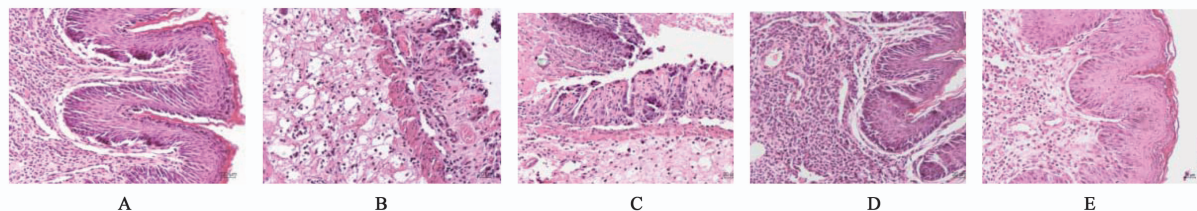
表 3 NLD 对小鼠体质量变化与肛门、直肠脏器指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Fig. 3 Effect of NLD on weight changes and rectoanal coefficient of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂质量/g·kg <sup>-1</sup>	体质量/g		肛门直肠脏器指数
		给药前	给药后	
正常	-	22.67 ± 0.82	29.18 ± 1.13	1.33 ± 0.43
模型	-	22.37 ± 0.70	23.01 ± 1.52	2.52 ± 0.50 <sup>4)</sup>
NLD	0.45	23.11 ± 0.67	26.88 ± 1.28	1.76 ± 0.45 <sup>2)</sup>
	0.9	22.50 ± 0.92	27.79 ± 1.84	1.74 ± 0.49 <sup>2)</sup>
	1.8	22.75 ± 0.67	28.21 ± 1.38	1.13 ± 0.25 <sup>2)</sup>

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

**3.3 小鼠肛门、直肠组织形态学变化** 正常组黏膜到浆膜结构层次清晰, 模型组复层扁平上皮受损, 黏膜结构破坏严重, 大量炎性细胞浸润, 黏膜下层血管扩张, NLD 0.45, 0.9, 1.8 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组对模型中的严重的炎症反应和血管扩张有明显的改善, 并减轻了炎性细胞的浸润, 减少了模型制备造成的出血。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C ~ E. NLD 0.45, 0.9, 1.8 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组 (图 2 同)

图 1 NLD 对小鼠肛门直肠组织炎症病理学的影响 (HE, × 200)

Fig. 1 Effect of NLD on pathology of rectoanal tissues in a rat model of rectoanal inflammation (HE, × 200)

**3.4 NLD 对核转录因子 NF- $\kappa$ B 在小鼠肛门直肠组织中 mRNA 表达水平的影响** 与正常组比较, 小鼠肛门、直肠组织中的 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, NLD 可显著下调 NF- $\kappa$ B 的高表达 ( $P < 0.01$ ), NLD 对 NF- $\kappa$ B 的 mRNA 高表达的抑制作用随剂量增加而增强, 有剂量依赖性。见表 4。

**3.5 NLD 对小鼠肛门直肠组织中炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 在小鼠肛门、直肠组织中 mRNA 表达的影响** NLD 干预后, 小鼠肛门直肠组织中的 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  与 COX-2 mRNA 的表达量皆有不同程度的降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, NLD 可显著下调 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  与 COX-2 的高表达 ( $P < 0.01$ ),

NLD 对 IL-1 $\beta$  与 COX-2 mRNA 的高表达的抑制作用呈倒 U 型趋势, NLD 0.9 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组抑制作用最强, 对 TNF- $\alpha$  的抑制作用随剂量增加而增强, 有剂量依赖性。见表 4。

**3.6 NLD 对小鼠肛门、直肠组织中核蛋白 NF- $\kappa$ B p65 表达水平的影响** 与正常组比较, 模型组中的 NF- $\kappa$ B p65 蛋白高表达, 不同剂量 NLD 均可逆转 NF- $\kappa$ B p65 的高表达, 抑制作用随剂量增加而增强。见图 2。

**3.7 NLD 对小鼠肛门直肠组织中炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 的蛋白表达的影响** 与正常组比较, 乙酸涂抹 3 d 小鼠肛门直肠组织中的 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  与 COX-2 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); NLD 干

表 4 NLD 对小鼠 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 mRNA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of NLD on levels of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2 mRNA in rectoanal ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NF- $\kappa$ B	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	COX-2
正常	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	2.52 ± 0.16 <sup>4)</sup>	1.94 ± 0.10 <sup>4)</sup>	27.61 ± 1.63 <sup>4)</sup>	17.29 ± 0.86 <sup>4)</sup>
NLD	0.45	1.75 ± 0.16 <sup>2)</sup>	1.11 ± 0.06 <sup>2)</sup>	23.20 ± 1.28 <sup>2)</sup>	11.84 ± 0.78 <sup>2)</sup>
	0.9	1.45 ± 0.12 <sup>2)</sup>	1.00 ± 0.06 <sup>2)</sup>	14.11 ± 0.74 <sup>2)</sup>	6.15 ± 0.60 <sup>2)</sup>
	1.8	1.58 ± 0.17 <sup>2)</sup>	0.98 ± 0.06 <sup>2)</sup>	23.48 ± 0.92 <sup>2)</sup>	11.06 ± 0.48 <sup>2)</sup>

预后,与模型组比较, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  与 COX-2 的蛋白表达不同程度的降低 ( $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  的蛋白表达无剂量依赖, IL-1 $\beta$  和 COX-2 的蛋白表达量随剂量增加呈 U 型趋势。见图 2。

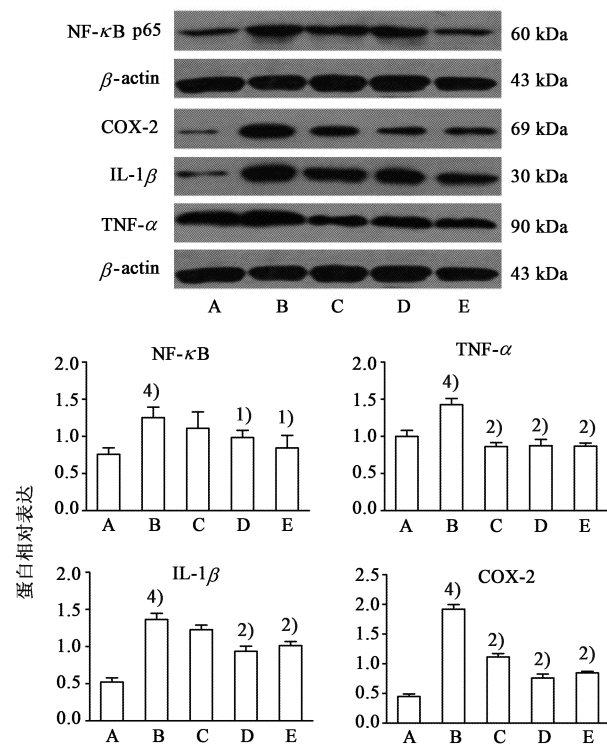


图 2 NLD 对小鼠 NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of NLD on levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 and NF- $\kappa$ B in rectoanal ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 4 讨论

痔是各种原因引起的血瘀肿块,主要临床症状为出血、疼痛和局部溃疡,并伴有病变部位的感染<sup>[19]</sup>。本实验所选的乙酸致小鼠肛门溃疡模型与痔发病的真实情况有差异,可看作是近似模型,用于外用药物的研究<sup>[20]</sup>。本研究以乙酸致小鼠肛门溃疡为模型,通过观察各组小鼠行为和体质量等方面的变化,发现 NLD 可明显减小肛门溃疡面,消除红肿和炎性渗出,改善体质量增长缓慢情况,并可降低

小鼠肛门直肠组织的脏器指数。提示, NLD 可改善肛门溃疡小鼠的炎症状态。通过形态学观察,结果发现 NLD 对肛门溃疡小鼠直肠部位的复层扁平上皮受损、黏膜结构破坏严重等情况具有明显的改善作用,且炎性细胞浸润及黏膜下层血管扩张明显减少,提示, NLD 对肛门溃疡小鼠的直肠组织形态结构具有保护作用。

近年来,炎症致使痔疮发生的理论越来越受到学者们的关注<sup>[21]</sup>,其中 NF- $\kappa$ B 通路在炎症的发生发展中占举足轻重的地位, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 等细胞因子为促炎因子,且被证实在转录水平由 NF- $\kappa$ B 调控。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等细胞因子水平升高, NF- $\kappa$ B 则不能与抑制蛋白结合,反而被蛋白酶水解,游离的 NF- $\kappa$ B 迅速进入胞核,与靶基因结合,促进促炎因子(TNF- $\alpha$  等)、趋化因子、黏附分子和酶(如 COX, NOS 等)的合成从而促进炎症反应<sup>[22]</sup>。本研究发现, NLD 可下调 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 mRNA 表达水平,推测可能的原因是 NLD 抑制 NF- $\kappa$ B 激活,降低炎症 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 COX-2 等相关因子的过度表达,进而阻止炎症信号的放大,减轻炎症反应。肾蕨水提取物成分复杂,且相对分子质量跨度较大,推测抗炎作用的发挥是通过多靶点实现的,具体的有效成分以及作用靶点有待进一步的研究。

综上所述, NLD 对乙酸所致的小鼠肛门溃疡炎症反应具有很好的改善作用,其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 表达,下调其下游相关炎症介质的表达水平有关。肾蕨在痔疮治疗中的作用及其良好的抗炎活性得到充分证实,为进一步研究开发提供了一定的支持。

#### [参考文献]

- [1] Dvorak A M, FENG D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle [J]. J Histochem Cytochem, 2001, 49(4):419-432.
- [2] 韩炜,王振军,赵博,等. 痔组织弹性纤维退变和血管

- 生成的机制及其意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2005, 8(1):56-59.
- [3] 周小莉. DH001 栓剂的药效学研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [4] Lohsiriwat V. Hemorrhoids: from basic pathophysiology to clinical management [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(17):2009-2017.
- [5] 李汉隆, 欧阳莎. 中重度痔疮采用吻合器痔上黏膜环切术联合硬化剂注射术治疗的临床效果分析[J]. 中华临床医师杂志, 2016, 10(8):1120-1123.
- [6] 徐伟, 倪平, 吴春珠. 塞来昔布在痔疮手术中的超前镇痛作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(6):464-466.
- [7] 刘史佳, 申龙树, 戴国梁, 等. IL-17、IL-6、TNF- $\alpha$  细胞因子在痔疮患者中的表达[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(3):201-204.
- [8] 南京中医药大学. 中药大辞典(修订本)(上)[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014:1629.
- [9] 王国强. 全国中草药汇编. 第2卷[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2014:625.
- [10] 王小青, 李爽, 赵涵, 等. 壮药肾蕨的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2017, 34(5):399-401.
- [11] 谢凤凤, 黎理, 马雯芳, 等. 肾蕨多糖提取工艺优化及其含量测定研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(41):7933-7935.
- [12] 赵莉, 杨文钰. 蕨类植物的活性成分研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(6):452.
- [13] 陈晓清, 苏育才, 李晓晶, 等. 抗菌肾蕨多糖的提取与分离[J]. 漳州师范学院学报: 自然科学版, 2006, 4(54):112-115.
- [14] 王音音, 李峰, 王霆. 红衫醇在植物种类中的分布[J]. 今日药学, 2008, 17(1):70-74.
- [15] 马宗国, 江南, 余梦瑶, 等. 痔疮动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(5):446-450.
- [16] 徐进, 宫毅, 杨阳, 等. 四黄痔疮膏对大鼠痔相近模型局部炎症及组织病理学的影响[J]. 中国肛肠病杂志, 2015, 35(10):7-12.
- [17] 马雅鸽, 赵声兰, 阮苑, 等. 地木耳菌粉对2型糖尿病大鼠血糖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2):111-114.
- [18] 韦婷, 王天虹, 曾勇, 等. 藏族药五味甘露药浴散加减方对佐剂关节炎大鼠的药效及其对大鼠血清 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1, EGF 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10):134-137.
- [19] Azeemuddin M, Viswanatha G L, Rafiq M, et al. An improved experimental model of hemorrhoids in rats: evaluation of antihemorrhoidal activity of an Herbal Formulation[J]. ISRN Pharmacol, 2014, 2014(3):1-7.
- [20] 于舒雁, 魏荣锐, 苗明三. 不同品种威灵仙水煎剂外用对大鼠痔疮、佐剂性关节炎模型的影响[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(4):391-397.
- [21] HU W S, LIN C L. Hemorrhoid is associated with increased risk of peripheral artery occlusive disease: a nationwide cohort study [J]. J Epidemiol, 2017, 27(12):574-577.
- [22] 姬培震, 张怡, 李雪萍, 等. 附子理中汤灌肠对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14):124-128.

[责任编辑 邹晓翠]