

· 药理 ·

## 基于 $\beta_2$ AR/ $\beta$ -arrestin2/NF- $\kappa$ B 信号通路的 清肠化湿颗粒防治溃疡性结肠炎的作用机制

戴路明, 朱磊, 沈洪\*

(南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**观察清肠化湿颗粒对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)模型大鼠及人结肠癌上皮细胞株 HT-29 炎症模型  $\beta_2$  肾上腺素受体( $\beta_2$ AR)/ $\beta$ -抑制蛋白 2( $\beta$ -arrestin2)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路的干预作用。**方法:**取 8 只大鼠作为空白组,其余大鼠采用三硝基苯磺酸(trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS)灌肠法复制 UC 大鼠模型;待模型建立成功后,随机分为模型组,柳氮磺胺吡啶(SASP,  $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组,清肠化湿颗粒低、中、高剂量( $2.8, 5.5, 11.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组,每组 8 只,灌胃给药 10 d,每日 1 次;酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定 UC 大鼠结肠组织中巨噬细胞移动抑制因子(MIF),基质金属蛋白酶-1(MMP-1), MMP-2, MMP-9, 胰岛素样生长因子-1(IGF-1), 超氧化物歧化酶(SOD), 丙二醛(MDA), 髓过氧化物酶(MPO), 一氧化氮(NO), 一氧化氮合成酶(iNOS), 谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px);免疫组化法检测模型大鼠结肠黏膜  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B 定位表达;采用肿瘤坏死因子与脂多糖诱导 HT-29 细胞炎症模型;噻唑蓝(MTT)比色法检测清肠化湿颗粒对细胞增殖的影响,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B 蛋白表达量。**结果:**造模后,模型组大鼠较空白组大鼠结肠黏膜的结肠损伤分数明显升高;与模型组比较,3 个剂量的清肠化湿颗粒给药组结肠黏膜损伤明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),大鼠结肠组织 IGF-1, SOD, GSH-Px 含量与  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2 表达明显上升, MIF, MMP-2, MMP-9, MDA, MPO, NO, iNOS 含量及 NF- $\kappa$ B 表达明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**清肠化湿颗粒可缓解 UC 氧化应激反应及肠道炎症,其作用与激活  $\beta_2$ AR/ $\beta$ -arrestin2/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎;清肠化湿颗粒;  $\beta_2$  肾上腺素受体;  $\beta$ -抑制蛋白 2; 核转录因子- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0086-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180837

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180125.1557.006.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-26 10:38

### Effect of Qingchang Huashi Granule on $\beta_2$ AR/ $\beta$ -arrestin2/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Ulcerative Colitis

DAI Lu-ming, ZHU Lei, SHEN Hong\*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Qingchang Huashi granule on  $\beta_2$  adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) / $\beta$ -arrestin2/nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway in rat and human ulcerative colitis. **Method:** Eight rats were randomly selected as control group, while the other rats were used to duplicate the ulcerative colitis model induced by trinitrobenzene sulfonic acid; after successful modeling, the rats were randomly divided into model group, salazosulfapyridine (SASP) group ( $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and low, medium and high-dose

**[收稿日期]** 20171026(021)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673905);国家中医药管理局项目(JDZX2015084);国家中医药行业科研专项(201407001);江苏省临床医学科技专项(BL2014100);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

**[第一作者]** 戴路明,副主任医师,从事消化系统疾病的治疗, E-mail: foolfishes@sina.com

**[通信作者]** \* 沈洪,博士,教授,主任医师,从事消化系统疾病研究, Tel:025-86617141-91601, E-mail: shenhong999@163.com

Qingchang Huashi granule groups (2.8, 5.5, 11.0 g·kg<sup>-1</sup>), with 8 rats in each group. The drugs were given once a day by gavage for 15 days. The levels of macrophage mobile inhibitory factor (MIF), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), macrophage migration inhibitory factor (MIF), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2, MMP-9, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (iNOS), glutathione peroxidase (GSH-Px) in experimental UC rats were measured by enzyme linked immunosorbent assay method (ELISA); immunohistochemical method was used to detect the location expressions of  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B in rat models; tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide were used to induce the HT-29 cell inflammation model; the effect of Qingchang Huashi granule on cell growth was detected by MTT method, the expressions of  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B were measured with Western blot. **Result:** The injury score of colonic mucosa in model group rats was significantly higher than that of the normal group, expressions of IGF-1, SOD, GSH-Px,  $\beta_2$ AR and  $\beta$ -arrestin2 decreased significantly, while expressions of MIF, MMP-2, MMP-9, MDA, MPO, NO, iNOS and NF- $\kappa$ B increased in UC model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). After intervened with Qingchang Huashi granule, these indicators all recovered to normal. **Conclusion:** Qingchang Huashi granule can reduce the pathological process of ulcerative colitis through  $\beta_2$ AR/ $\beta$ -arrestin2/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

[**Key words**] ulcerative colitis; Qingchang Huashi granule;  $\beta_2$ -adrenergic receptor;  $\beta$ -arrestin2; nuclear transcription factor-kappaB

溃疡性结肠炎(UC)属于中医“泄泻”,“痢疾”,“肠癖”等范畴,《黄帝内经》最早总结了本病的病名,东汉张仲景在《伤寒杂病论》中有“下利赤白”,“热利下重”,“便脓血”等症状描述。中医学对其发病机制尚未形成统一认识,但患者多有先天禀赋不足,脾胃功能失健的病理基础,复感湿热之邪或饮食不调,酿生湿热,或寒湿化热客于肠腑,气机不畅,通降不利,血行瘀滞,脂络受损而成内疡。

现代医学认为 UC 是一种病因不明的慢性非特异性,反复发作的肠道炎症性疾病,其特征表现为持续性腹泻,黏液脓血便,腹痛等<sup>[1-3]</sup>。目前临床常用的治疗西药包括氨基水杨酸类、皮质类固醇激素、免疫调节剂及生物制剂,虽然可诱导 UC 缓解,但停药后容易复发,长期用药不良反应多,且对顽固性病例疗效并不理想<sup>[4]</sup>。因此,研究开发既能调控肠道炎症又能减少毒副作用的药物,成为目前 UC 药物开发的重要方向和热点。而中医药治疗成为 UC 防治的重要途径和手段<sup>[5]</sup>。

清肠化湿颗粒为江苏省中医院院内制剂,方由黄连、黄芩、白头翁、木香等中药组成。针对 UC 活动期的病机特点制备的清肠化湿颗粒,集清热除湿,调气和血,凉血化瘀,生肌敛疡于一体,正合 UC 活动期湿热蕴结,气滞血瘀,肠络受损之病机,能够有效缓解患者脓血便,腹痛,腹泻等症状<sup>[6-7]</sup>。本实验通过采用三硝基苯磺酸(trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS)诱发大鼠 UC 模型,在此基础上观察清

肠化湿颗粒对大鼠结肠组织损伤的修复作用,并采用肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 HT-29 细胞炎症模型,体外观察清肠化湿颗粒对  $\beta_2$  肾上腺素受体( $\beta_2$ AR)/ $\beta$ -抑制蛋白 2( $\beta$ -arrestin2)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路的影响。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞株** SPF 级 SD 大鼠 58 只,雄性,体质量(220 ± 20)g,由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(苏)2015-0004,大鼠分笼饲养,置于温度(25 ± 2)℃,湿度 50% ~ 60% 的饲养室。每日光照 8 h。饮水为高温灭菌水,饲料为常规饲料。动物均自由饮水,进食,动物实验由南京中医药大学动物伦理委员会批准实施。人结肠癌上皮细胞株(HT-29)购自中国科学院细胞库。

**1.2 药物及试剂** 清肠化湿颗粒(江苏省中医院药房,批号 1613001);柳氮磺胺吡啶片(SASP,上海三维制药有限公司,批号 20160902);巨噬细胞移动抑制因子(MIF),基质金属蛋白酶-1(MMP-1),MMP-2,MMP-9,胰岛素样生长因子-1(IGF-1)试剂盒(上海远慕生物科技有限公司,批号分别为 20161221, 20161228, 20161218, 20161211, 20161201);超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),髓过氧化物酶(MPO),一氧化氮(NO),一氧化氮合成酶(iNOS),谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为

20161106, 20161221, 20161223, 20161212, 20161218, 20161221); 5% TNBS (美国 Sigma 公司, 批号 3LBD6811V); McCoy's 5a 培养基, 脂多糖 (LPS) (美国 Sigma 公司, 批号分别为 20170110, 20160618); BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒 (美国 Thermo 公司, 批号 20161224); 预先染色的蛋白相对分子质量对照 marker (美国 Thermo 公司, 批号 20160810); 兔抗  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B 抗体 (美国 Invitrogen 公司, 批号分别为 20161212, 20161012, 20161213); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (南京晶美生物工程有限公司, 批号 20170118); 10% 水合氯醛 (成都科龙化工试剂厂, 批号 20160715);  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 20170212); 噻唑蓝 (MTT, 上海华蓝化学科技有限公司, 批号 20160923)。

**1.3 仪器** ZFMQ050PE 型超纯水器 (美国 Millipore 公司), 5810 型低温超速离心机 (德国 Eppendorf 公司), A5002 型酶联免疫检测仪 (瑞士 Tecan 公司), 164-5052 型垂直电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司), PVDF (3010040001 膜微孔性的聚偏乙烯双氟化物膜) (瑞士 Roche 公司), X 射线胶片 (美国 Eastman Kodak Company 公司), Odyssey 型近红外双色扫描系统 [芯起点基因科技 (北京) 有限公司], CX22 型倒置显微镜及荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠造模与给药** 采用 TNBS 灌肠法复制 UC 大鼠模型<sup>[8]</sup>。造模前禁食 24 h, 随机留取 8 只大鼠作为空白组, 其余大鼠 10% 水合氯醛 ( $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 腹腔注射麻醉; 用 16 号大鼠灌胃针轻轻从肛门插入, 推入 TNBS 溶液 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TNBS + 50% 乙醇 0.25 mL), 捏紧肛门提尾倒立 3 min 后, 放回笼中自然苏醒, 待模型建立成功后, 随机分为模型组, SASP ( $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组, 清肠化湿颗粒低、中、高剂量 (2.8, 5.5,  $11.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组, 常规饲养。其中清肠化湿颗粒用蒸馏水配成质量浓度为 0.28, 0.55,  $1.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的悬液<sup>[9-10]</sup>, SASP 用蒸馏水配成质量浓度为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液, 给药体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。空白组及模型组给予等体积蒸馏水, 每日 1 次, 连续 10 d。

**2.2 大鼠一般情况观察** 观察各组大鼠精神状态, 皮毛光泽度, 活动能力, 饮水饮食量, 体质量, 粪便性状及存活情况。

**2.3 指标检测** 末次给药 24 h 后, 取每只大鼠粪

便 200 g, 以生化法测定大便乳酸含量。脱颈椎法处死大鼠, 取肛门至盲肠部结肠 (约 8 cm), 沿肠系膜纵轴剪开, 用冷生理盐水冲洗干净, 观察结肠黏膜大体形态损伤情况并评分, 具体计算方法参照 Bell 等<sup>[11]</sup>的方法。然后将其用 4% 甲醛固定, 石蜡包埋,  $4 \mu\text{m}$  连续切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色镜下做病理观察, 并参照 Dieleman 等<sup>[12]</sup>的标准计算结肠黏膜组织学损伤评分。测定结肠组织前列腺素  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) 含量, 具体测定方法为取结肠组织约 3 cm, 剪碎后用生理盐水 5 mL 浸泡 1 h, 离心浸泡液, 吸取上清液 0.5 mL, 加  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾-甲醇液稀释至 3 mL, 于波长 278 nm 处测定其吸光度  $A$ 。另一部分于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冻存, 免疫组化法观察大鼠结肠组织中  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 的表达水平, 黄嘌呤氧化酶法测定 SOD, 硫代巴比妥酸反应产物比色 (TBA) 法测定 MDA, 硝酸还原酶法测定 NO, 髓过氧化物酶测定 MPO, iNOS 试剂盒通过吸收度测定计算 iNOS 活性, 酶促反应计算 GSH-Px 活性, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定 UC 大鼠结肠组织中 MIF, MMP-1, MMP-2, MMP-9, IGF-1 指标, 按试剂盒说明书进行操作。

**2.4 免疫组化法检测大鼠结肠黏膜组织  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 表达** 将各组大鼠结肠组织的石蜡切片,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  烤片 4 h 后, 依次用二甲苯 I, 二甲苯 II, 无水乙醇 I, 无水乙醇 II, 95% 乙醇, 90% 乙醇, 85% 乙醇, 75% 乙醇各 10 min 脱蜡, 水化; 然后用  $1 \times$  PBS 缓冲液 (pH 7.2) 洗涤切片 3 次, 每次 5 min; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  滴加在组织切片上, 室温下静置 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加正常羊血清工作液封闭,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  10 min, 倾去勿洗。滴加一抗 (1:200),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱孵育过夜, PBS 冲洗; 滴加生物素标记二抗,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 冲洗; DAB 反应染色 5 min, 自来水终止显色, 苏木精复染, 1% 盐酸-乙醇分化 1 s; 自来水冲洗 10 min; 常规脱水, 透明, 干燥, 中性树胶封片, 在显微镜下观察免疫组化结果, 并用 Image-ProPlus 进行图像分析, 以棕褐色染色为阳性表达。高倍镜下随机选取 3 个视野, 参照 Fromowitz 等<sup>[13]</sup>半定量分级方法, 在高倍镜下对组织作如下评分: ①无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; ②阳性范围  $< 5\%$  为 0 分,  $5\% \sim 25\%$  为 1 分,  $26\% \sim 50\%$  为 2 分,  $51\% \sim 75\%$  为 3 分,  $> 75\%$  为 4 分。两项结果相加  $< 2$  分为阴性 (-), 2~3 分为弱阳性 (+), 4~5 分为中度阳性 (++) , 6~7 分为强阳性 (+++)

**2.5 细胞造模及给药** 细胞分为 6 组,空白组加入含 2% FBS 的 McCoy5a 培养基孵育,实验过程中不予任何药物干预,模型组给予肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 12 h 后,再予 LPS (1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[14]</sup> 孵育 15 h,实验组在上述药物干预的基础上,加入 SASP (2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[15]</sup>,根据前期预实验结果,加入清肠化湿颗粒低 (100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),中 (1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),高 (10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 质量浓度孵育 24 h。采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测实验药物对细胞生长影响时,加入二甲基亚砷 (DMSO) 作为阳性组。

**2.6 细胞检测指标** 采用 MTT 比色法检测实验药物对细胞生长影响,取对数生长期 HT-29 细胞,按  $1 \times 10^4$  个/孔的密度同时接种于 2 块 96 孔培养板中,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,待细胞生长至 80% 融合时,更换为分别含有上述浓度药物的培养基继续培养,培养结束前 4 h,加入质量浓度为 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,4 h 后吸弃培养基,每孔加入 100% DMSO 溶液 150  $\mu\text{L}$  溶解甲瓟颗粒,酶标仪测定  $A_{490 \text{ nm}}$ 。分别在 24,48,72 h 各测定 1 次生长情况,3 个时间点分别设立阴性组和 0.1% DMSO 组,各组均设 3 个复孔。用于蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组细胞  $\beta_2\text{AR}$ , $\beta$ -arrestin2,NF- $\kappa\text{B}$  p56 表达。

**2.7 Western blot 检测细胞  $\beta_2\text{AR}$ , $\beta$ -arrestin2,NF- $\kappa\text{B}$  p56 的表达** 调整 HT-29 细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/mL,种植于 6 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养至细胞生长至 70% ~ 80%,模型组及药物组干预结束后,弃上清培养基,每孔加入含 PMSF 及 Phosphatase Inhibitor Cocktail 的 RIPA 裂解液 250  $\mu\text{L}$ ,移液器吹打数下。充分裂解后,4  $^{\circ}\text{C}$  13 000  $\times g$  离心 30 min,取上清即为总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,进行蛋白定量。取蛋白上清液 10  $\mu\text{L}$ ,按 4:1 加入 5 倍量上样缓冲液,沸水浴煮 5 min,点样于 10% 和 15% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳,起始电压 80 V,待溴酚兰达到浓缩胶时,更换电压至 120 V,直到电泳结束。剪取与凝胶大小一致的 PVDF 膜,按照海绵垫-3 张滤纸-凝胶-PVDF 膜-3 张滤纸-海绵垫的顺序制备夹层物,注意排尽气泡,放入盛有转膜缓冲液的槽中,稳流 250 mA 转膜 90 min。取出 PVDF 膜,置于封闭液中,室温封闭 2 h。弃去封闭液,加入 1:200 稀释的一抗 (用 TBST 配置的 5% 的脱脂牛奶稀释),4  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 5 min。加入羊抗兔 IgG-HRP (1:40 000),室温孵育 1.5 h, TBST 漂洗 3 次,每次 15 min。加入 ECL 显色液,充分吹打 3 min,沥干 PVDF 膜,用保鲜膜包裹,置于暗

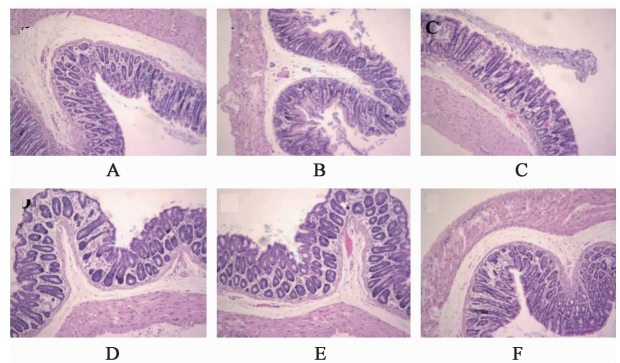
盒中,暗房中曝光 2 min,显影,定影。相应蛋白表达值为条带的灰度值除以  $\beta$ -action 内参校正。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 对数据进行分析处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用配对  $t$  检验,多组间比较采用 One-ANOVA。统计作图采 GraphPad Prism5。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 UC 大鼠一般情况** 空白组大鼠体质量增加明显,体毛光泽,精神状态好,反应迅速,活动能力强,饮水进食量正常,无腹泻便血,未见死亡。各造模大鼠在造模后出现黏液便,甚至出现血便,烦躁,活动减少,食欲减退,毛色欠光泽,体质量明显下降。经清肠化湿颗粒干预后,各组大鼠未见血便,以稀便为主,食欲增强,毛色渐光泽,活动变多,饮水进食量增加,体质量逐渐回升。

**3.2 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠组织病理学改变的影响** 空白组大鼠结肠黏膜组织结构完整,间质偶见散在少量炎性细胞浸润,未见黏膜糜烂溃疡形成;UC 大鼠结肠组织结构异常,可见肠黏膜缺损形成不同程度的溃疡,局部大量炎细胞浸润还伴有轻度的结肠组织增生,腺体破坏,结构紊乱,杯状细胞减少,黏膜层及黏膜下层较多的炎细胞浸润,局部隐窝脓肿形成;清肠化湿颗粒高、中、低剂量组,SASP 组大鼠结肠黏膜基本完整,局部可见少许肠黏膜上皮细胞变性坏死脱落,黏膜层内少量炎细胞浸润。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. SASP 组;D ~ F. 清肠化湿颗粒低、中、高剂量组 (图 2,3 同)

图 1 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠组织病理学改变的影响 (HE,  $\times 200$ )  
Fig.1 Effect of Qingchang Huashi granule on pathological changes of UC rats (HE,  $\times 200$ )

**3.3 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠生化指标的影响** 与空白组比较,造模后 UC 大鼠肠黏膜损伤严重,大鼠乳酸含量和  $\text{PGE}_2$  含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。与

模型组比较,各剂量的清肠化湿颗粒干预组大鼠肠黏膜损伤程度得到明显改善( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且随着剂量的升高损伤改善程度越明显,同时清肠

化湿颗粒各剂量组大鼠乳酸和 PGE<sub>2</sub> 含量显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且两者在清肠化湿颗粒高剂量组与 SASP 组间无统计学差异。见表 1。

表 1 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠形态与组织学损伤分数,大便乳酸及 PGE<sub>2</sub> 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of Qingchang Huashi granule on damage score of rat colon morphology and histological, content of fecal lactate and PGE<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	结肠黏膜形态损伤/分	结肠组织学损伤/分	乳酸/mg·g <sup>-1</sup>	PGE <sub>2</sub> /A
空白	-	-	-	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02
模型	-	9.54 ± 2.71	10.66 ± 1.71	0.52 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.78 ± 0.12 <sup>2)</sup>
SASP	1.00	3.86 ± 2.10 <sup>4)</sup>	5.65 ± 1.10 <sup>4)</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>4)</sup>
清肠化湿颗粒	2.80	9.35 ± 2.17	9.75 ± 1.23	0.32 ± 0.07 <sup>3)</sup>	0.60 ± 0.12
	5.50	6.48 ± 2.18 <sup>3)</sup>	8.25 ± 1.41 <sup>3)</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>3)</sup>
	11.00	4.24 ± 2.57 <sup>4)</sup>	5.70 ± 1.03 <sup>4)</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.30 ± 0.13 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 2~7 同)。

**3.4 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠 SOD, MDA, GSH-Px 的影响** 与正常组比较,UC 组大鼠 SOD, GSH-Px 水平显著降低( $P < 0.01$ ),MDA 水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,UC 大鼠经过 SASP 和不同剂量的清肠化湿颗粒治疗,这些指标均得到不同程度的改善。其中 SASP 组和清肠化湿颗粒高、中剂量组的 SOD, GSH-Px 水平显著升高( $P < 0.01$ ),而两组 MDA 水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),并且清肠化湿颗粒各剂量组之间呈现一定的剂量依赖性。见表 2。

**3.5 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠 MPO, NO, iNOS, IGF-1, MIF 的影响** 与空白组比较,UC 组大鼠 MPO, iNOS 活性与 NO, MIF 含量明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),IGF-1 含量显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,UC 大鼠经过 SASP 和不同剂量的清肠化湿颗粒治疗,这些指标均得到不同程度的改善。其中 SASP 组和清肠化湿颗粒高、中剂量组的 MPO,

表 2 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠组织 SOD, MDA, GSH-Px 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of Qingchang Huashi granule on levels of SOD, MDA, GSH-Px in UC colon organization( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>	MDA /μmol·g <sup>-1</sup>	GSH-Px /U·mg <sup>-1</sup>
空白组	-	83.46 ± 5.47	4.31 ± 0.47	944.75 ± 69.17
模型组	-	52.36 ± 3.36 <sup>2)</sup>	8.85 ± 0.76 <sup>2)</sup>	602.56 ± 82.15 <sup>2)</sup>
SASP 组	1.00	80.05 ± 5.44 <sup>4)</sup>	5.24 ± 0.87 <sup>4)</sup>	870.75 ± 50.02 <sup>4)</sup>
清肠化湿颗粒	2.80	69.92 ± 6.08 <sup>3)</sup>	8.02 ± 0.55	668.89 ± 81.21 <sup>3)</sup>
	5.50	72.36 ± 3.90 <sup>4)</sup>	7.21 ± 0.75 <sup>3)</sup>	772.68 ± 67.82 <sup>4)</sup>
	11.00	79.41 ± 4.75 <sup>4)</sup>	6.08 ± 0.54 <sup>4)</sup>	861.05 ± 91.09 <sup>4)</sup>

iNOS 活性与 NO, MIF 含量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),IGF-1 含量显著上升( $P < 0.01$ ),并且清肠化湿颗粒各剂量组之间呈现一定剂量依赖性关系。见表 3。

表 3 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠组织 MPO, iNOS 活性及 NO, MIF, IGF-1 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of Qingchang Huashi granule on activity of MPO, iNOS, and content of NO, MIF, IGF-1 in UC colon organization( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MPO /U·g <sup>-1</sup>	iNOS /U·mg <sup>-1</sup>	NO /μmol·g <sup>-1</sup>	MIF /μg·L <sup>-1</sup>	IGF-1 /μg·L <sup>-1</sup>
空白	-	0.76 ± 0.06	2.48 ± 0.18	1.36 ± 0.12	80.15 ± 27.39	112.64 ± 23.41
模型	-	2.21 ± 0.12 <sup>2)</sup>	3.65 ± 0.17 <sup>1)</sup>	3.78 ± 0.33 <sup>2)</sup>	297.21 ± 18.92 <sup>2)</sup>	54.78 ± 20.36 <sup>2)</sup>
SASP	1.00	0.78 ± 0.13 <sup>4)</sup>	2.68 ± 0.18 <sup>4)</sup>	1.66 ± 0.28 <sup>4)</sup>	87.18 ± 21.23 <sup>4)</sup>	98.47 ± 4.91 <sup>4)</sup>
清肠化湿颗粒	2.80	1.45 ± 0.17	3.12 ± 0.16	2.96 ± 0.21	216.34 ± 10.89 <sup>3)</sup>	67.91 ± 3.29
	5.50	0.98 ± 0.09 <sup>4)</sup>	2.93 ± 0.35	2.54 ± 0.18 <sup>3)</sup>	165.23 ± 21.13 <sup>4)</sup>	84.29 ± 6.18 <sup>4)</sup>
	11.00	0.85 ± 0.09 <sup>4)</sup>	2.72 ± 0.36 <sup>3)</sup>	1.82 ± 0.25 <sup>4)</sup>	100.31 ± 12.31 <sup>4)</sup>	96.61 ± 1.79 <sup>4)</sup>

**3.6 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠组织  $\beta_2AR$ ,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 表达的影响** 与空白组比较, UC 大鼠结肠黏膜组织  $\beta_2AR$  与  $\beta$ -arrestin2 阳性表达率明显降低 ( $P < 0.05$ ), 呈弱阳性表达; 而 NF- $\kappa$ B p56 阳性表达率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 呈中度阳性表达。与模型组比较, 高剂量清肠化湿颗粒组和 SASP 组治疗后结肠黏膜  $\beta_2AR$  与  $\beta$ -arrestin2 的阳性表达率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 呈中度阳性表达; 而 NF- $\kappa$ B p56 阳性表达率明显降低 ( $P < 0.05$ ), 呈弱阳性表达。见图 2, 表 4。

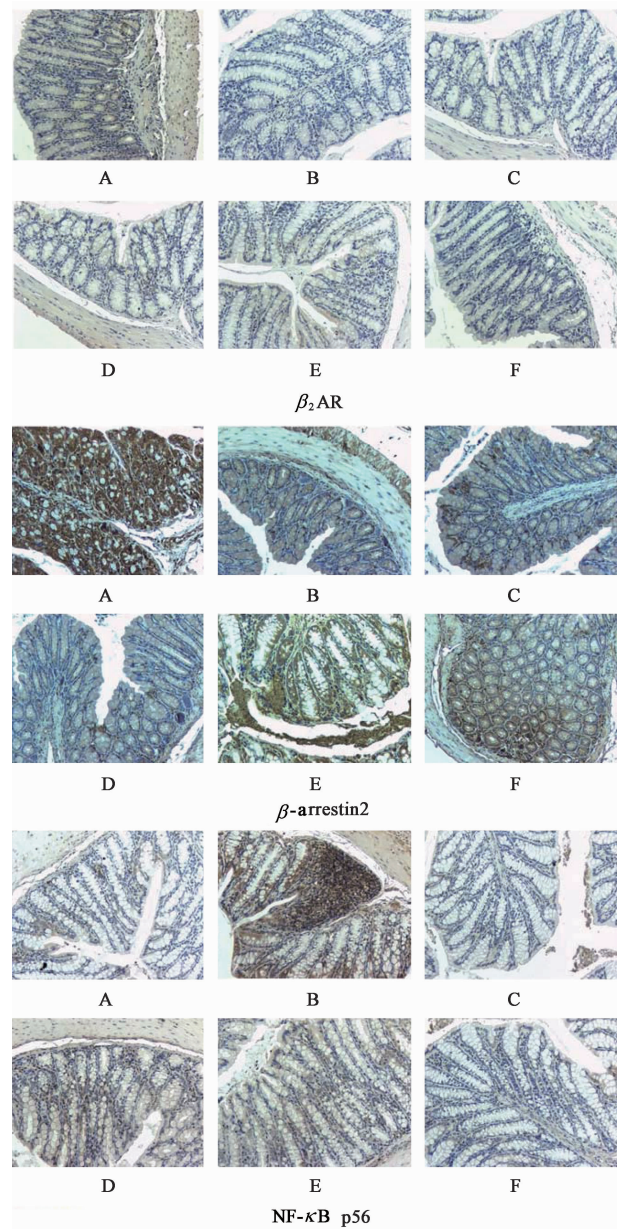


图 2 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠组织  $\beta_2AR$ ,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 表达的影响 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of Qingchang Huashi granule on expression of  $\beta_2AR$ ,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 in UC colon organization (IHC,  $\times 200$ )

表 4 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠组织  $\beta_2AR$ ,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 阳性表达率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Qingchang Huashi granule on positive expression rates of  $\beta_2AR$ ,  $\beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 in UC colon organization ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	$\beta_2AR$	$\beta$ -arrestin2	NF- $\kappa$ B p56
空白	-	16.27 ± 1.12	17.26 ± 1.21	12.54 ± 1.13
模型	-	10.54 ± 1.28 <sup>1)</sup>	12.58 ± 1.13 <sup>1)</sup>	17.78 ± 1.42 <sup>1)</sup>
SASP	1.00	16.08 ± 1.33 <sup>3)</sup>	17.05 ± 1.24 <sup>3)</sup>	13.58 ± 1.13 <sup>3)</sup>
清肠化湿颗粒	2.80	11.68 ± 1.08	13.38 ± 1.03	16.24 ± 1.02
	5.50	13.24 ± 1.18	14.86 ± 1.23	14.56 ± 1.12
	11.00	15.82 ± 1.72 <sup>3)</sup>	16.78 ± 1.42 <sup>3)</sup>	13.82 ± 1.25 <sup>3)</sup>

**3.7 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠 MMP-1, MMP-2, MMP-9 的影响** 与空白组比较, UC 组大鼠 MMP-1, MMP-2, MMP-9 含量显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 清肠化湿颗粒干预后, 这些指标的含量均不同程度的降低 ( $P < 0.01$ ); 不同剂量清肠化湿颗粒组之间比较发现, 其干预效果在各个指标中均呈一定的剂量依赖性关系, 且高剂量的清肠化湿颗粒组对指标的调节作用与 SASP 组比较, 无统计学差异。见表 5。

表 5 清肠化湿颗粒对 UC 大鼠结肠组织 MMP-1, MMP-2, MMP-9 的含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Effect of Qingchang Huashi granule on content of MMP-1, MMP-2, MMP-9 in UC colon organization ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	MMP-1	MMP-2	MMP-9
空白	-	0.87 ± 0.11	0.38 ± 0.06	16.15 ± 2.63
模型	-	0.19 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.13 ± 0.04 <sup>2)</sup>	30.28 ± 2.34 <sup>2)</sup>
SASP	1.00	0.63 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.45 ± 0.08 <sup>4)</sup>	18.43 ± 2.89 <sup>4)</sup>
清肠化湿颗粒	2.80	0.27 ± 0.08	0.76 ± 0.03	26.31 ± 3.11
	5.50	0.45 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.64 ± 0.07 <sup>4)</sup>	20.39 ± 2.76 <sup>4)</sup>
	11.00	0.68 ± 0.10 <sup>4)</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>4)</sup>	18.87 ± 2.91 <sup>4)</sup>

**3.8 清肠化湿颗粒对 HT-29 细胞增殖情况的影响** 采用 TNF- $\alpha$  与 LPS 诱导 UC 细胞模型, 在此基础上采用 MTT 比色法观察不同质量浓度的清肠化湿颗粒对 HT-29 细胞增殖情况的影响。结果显示, 与空白组比较, 模型组 HT-29 细胞增殖情况受到抑制, 而模型组 HT-29 细胞加入清肠化湿颗粒干预 24, 48, 72 h 后细胞增殖情况发生了改变。其中, 不同质量浓度的清肠化湿颗粒与细胞共培养 72 h 后, HT-29 细胞增殖良好, 且与 24 h 及 48 h 时细胞增殖

率比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。此外,高质量浓度清肠化湿颗粒组与 SASP 组比较,细胞增殖率均相同,不同剂量清肠化湿颗粒组的生长趋势与空白组均一致,见表 6。

表 6 清肠化湿颗粒对 HT-29 细胞增殖 A 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 6 Effect of Qingchang Huashi granule on proliferation A of HT-29 in different cell group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
正常	-	0.36 ± 0.08	0.78 ± 0.11	1.04 ± 0.18
模型	-	0.28 ± 0.10	0.56 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.64 ± 0.09 <sup>2)</sup>
SASP	2 <sup>5)</sup>	0.36 ± 0.06 <sup>3)</sup>	0.76 ± 0.12 <sup>3)</sup>	1.02 ± 0.15 <sup>4)</sup>
清肠化湿颗粒	0.1	0.34 ± 0.04	0.72 ± 0.10 <sup>3)</sup>	0.98 ± 0.16 <sup>4)</sup>
	1	0.38 ± 0.05 <sup>3)</sup>	0.74 ± 0.09 <sup>3)</sup>	1.00 ± 0.14 <sup>4)</sup>
	10	0.36 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.76 ± 0.12 <sup>3)</sup>	1.02 ± 0.12 <sup>4)</sup>

注: <sup>5)</sup>表示单位为 mmol·L<sup>-1</sup> (表 7 同)。

3.9 清肠化湿颗粒对 HT-29 细胞  $\beta_2AR/\beta$ -arrestin2/NF- $\kappa$ B p56 通路的影响 正常 HT-29 细胞  $\beta_2AR$  与  $\beta$ -arrestin2 表达较高, NF- $\kappa$ B p56 表达较少, 而模型组  $\beta_2AR$  与  $\beta$ -arrestin2 表达明显下降, NF- $\kappa$ B p56 表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 清肠化湿颗粒和 SASP 干预后 HT-29 细胞  $\beta_2AR$  与  $\beta$ -arrestin2 表达显著增加, NF- $\kappa$ B p56 表达显著下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3, 表 7。

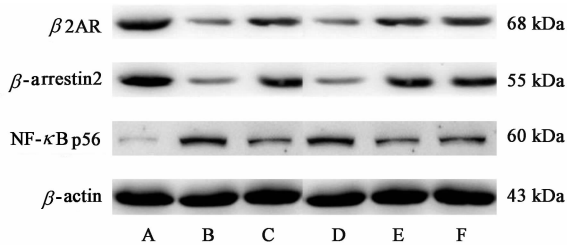


图 3 各组 HT-29 细胞  $\beta_2AR, \beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 的变化  
Fig. 3 Change of  $\beta_2AR, \beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 in different cell group

#### 4 讨论

近年来 UC 在我国的发病率呈逐年增加的趋势, 已成为临床常见的难治性疾病。清肠化湿颗粒是根据沈洪教授多年从事脾胃病临床与教学的经验以及课题组前期对清肠化湿方的研究从而制剂得到, 主要由黄连、黄芩、白头翁、木香等中药组成。其中, 黄芩与黄连清热燥湿; 煨木香, 炒白芍与地榆理气和血; 白芷消痈敛疮; 徐长卿理气止痛; 甘草调和诸药, 这些药集清热除湿, 调气和血, 凉血化瘀, 生肌

表 7 清肠化湿颗粒对 HT-29 细胞  $\beta_2AR, \beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of Qingchang Huashi granule on expression of  $\beta_2AR, \beta$ -arrestin2, NF- $\kappa$ B p56 in HT-29 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	$\beta_2AR$ / $\beta$ -actin	$\beta$ -arrestin2 / $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B p56 / $\beta$ -actin
正常	-	0.51 ± 0.08	0.87 ± 0.11	0.38 ± 0.06
模型	-	0.12 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.19 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.13 ± 0.04 <sup>2)</sup>
SASP	2 <sup>5)</sup>	0.48 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.63 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.45 ± 0.08 <sup>4)</sup>
清肠化湿颗粒	0.1	0.20 ± 0.04 <sup>3)</sup>	0.27 ± 0.08	0.76 ± 0.03 <sup>4)</sup>
	1	0.38 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.45 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.64 ± 0.07 <sup>4)</sup>
	10	0.45 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.68 ± 0.10 <sup>4)</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>4)</sup>

敛疡于一体, 正合 UC 湿热蕴结, 气滞血瘀, 肠络受损的病机, 对于 UC 发生发展阶段的氧化应激反应, 炎症反应, 肠道细胞外基质 (ECM) 的降解和黏膜溃疡的病理特征具有缓解作用。

研究发现, 氧化应激与 UC 的发生有密切关系<sup>[16]</sup>。氧化应激引起活性氧 (ROS) 大量表达, 一方面 ROS 与细胞膜上的多链不饱和脂肪酸结合, 发生脂质过氧化反应产生 MDA 脂质过氧化物, 因此, MDA 的含量可反映 UC 大鼠体内脂质过氧化程度和细胞受 ROS 攻击损伤程度。另一方面 ROS 在正常杀菌防御同时, 也对正常组织细胞造成损伤<sup>[17]</sup>。SOD 是机体抗氧化的重要指标, 可有效清除 ROS, 抑制 UC 大鼠结肠组织内脂质过氧化反应。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶, 可清除 ROS 和 MDA 脂质过氧化物, 从而保护细胞膜结构和功能的完整<sup>[18]</sup>。本研究发现, 清肠化湿颗粒可降低 MDA 含量, 升高 SOD, GSH-Px 活性, 调节体内过氧化反应与抗脂质过氧化反应, 从而减轻 UC 大鼠结肠组织损伤。

据研究报道, 氧化应激可通过诱导细胞因子, 促炎因子及其他炎症反应的中介物从而引发全身炎症反应<sup>[19]</sup>。MPO 是中性粒细胞杀伤病原微生物时发挥显著作用的一种酶, 其含量的升高可反映炎症细胞浸润程度, 是评价肠道炎症严重程度的指标<sup>[20]</sup>。当中性粒细胞受到病理刺激时会表达诱导型 iNOS, 生成大量 NO, 从而阻断线粒体功能干预细胞的正常能量代谢, 造成细胞损伤, 对肠黏膜有促进炎症和杀伤毒性的影响<sup>[21]</sup>。IGF-1 是肝细胞分泌的一种活性蛋白多肽物质, 可促进上皮细胞生长与修复, 在高炎症状态下 IGF-1 的分泌被抑制<sup>[22]</sup>。研究结果显示, 清肠化湿颗粒可降低 UC 大鼠 MPO, iNOS 活性

及 NO 含量,增加 IGF-1 含量,从而降低肠道炎症程度。

NF- $\kappa$ B 是一种转录因子,它的活化可促进多种促炎细胞因子的表达,在炎症反应中发挥重要的调节作用<sup>[23]</sup>。NF- $\kappa$ B 主要由 RelA(p65)和 NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> 组成,这些 NF- $\kappa$ B 二聚体主要在胞质中与抑制蛋白形成复合物,以无活性状态存在,抑制蛋白家族 I $\kappa$ B 存在于静息细胞中。NF- $\kappa$ B 可通过多种刺激被活化,并导致 I $\kappa$ B 特定位点的磷酸化及 I $\kappa$ B 的降解,随后 NF- $\kappa$ B 从胞质迁移到胞核中并释放出来<sup>[24]</sup>。研究发现,NF- $\kappa$ B 的表达可被  $\beta$ -arrestins 抑制,其中  $\beta$ -arrestins 是 arrestin 家族的一员,它通过结合 I $\kappa$ B $\alpha$  和 IKK,抑制 CK2 和 IKK 对 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化,从而减弱 NF- $\kappa$ B p56 的活化<sup>[25]</sup>。因此, $\beta$ -arrestin2 表达降低是 UC 大鼠体内 NF- $\kappa$ B 过度活化的重要原因。而  $\beta$ -arrestins2 的表达受到  $\beta_2$ AR 受体表达的影响, $\beta_2$ AR 的减少会导致  $\beta$ -arrestin2 的下调, $\beta_2$ AR 可通过调节  $\beta$ -arrestin2 表达水平参与 TLR4 介导的信号转导途径,同时其还可通过  $\beta$ -arrestin2 稳定抑制蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  从而调控 NF- $\kappa$ B 的活化过程<sup>[26]</sup>。本研究发现,UC 大鼠  $\beta_2$ AR 与  $\beta$ -arrestin2 表达明显下降,NF- $\kappa$ B p56 表达明显增加,这也与相关研究报道相一致<sup>[27]</sup>。清肠化湿颗粒治疗可显著增加  $\beta_2$ AR 与  $\beta$ -arrestin2 表达,降低 NF- $\kappa$ B p56 表达,提示清肠化湿颗粒可通过调控  $\beta_2$ AR/ $\beta$ -arrestin2/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻 UC 大鼠结肠组织病变。

MIF 作为一种调节免疫和炎症反应的关键细胞因子,可诱导巨噬细胞过度分泌 MMPs 从而降解 ECM 及基底膜。MMP-1, MMP-2, MMP-9 是降解肠道内 ECM 胶原的主要酶类,其过度表达会导致肠黏膜屏障破坏,引发溃疡发生<sup>[28-30]</sup>。因此,检测 MMP-1, MMP-2, MMP-9 在结肠病变组织中的表达可作为评价 UC 大鼠病情活动性及严重程度的指标。本研究发现,UC 模型大鼠结肠组织 MMP-1, MMP-2, MMP-9 含量显著增加,经过清肠化湿颗粒治疗后, MMP-1, MMP-2, MMP-9 均呈下降趋势,提示清肠化湿颗粒可保护肠黏膜屏障的完整性。

综上所述,清肠化湿颗粒可通过调节氧化应激反应,从而缓解肠道炎症,其作用与激活  $\beta_2$ AR/ $\beta$ -arrestin2/NF- $\kappa$ B 信号通路有关,两者最后可通过抑制 ECM 及基底膜的降解从而防止溃疡的发生。

[参考文献]

[1] Sonnenberg E, Siegmund B. Ulcerative colitis [J].

Digestion, 2016, 94(4): 181-185.

[2] Laurell A, Sjoberg K. Prebiotics and synbiotics in ulcerative colitis [J]. Scand J Gastroenterol, 2017, 52(4): 1-9.

[3] Patil D T, Moss A C, Odze R D. Role of histologic inflammation in the natural history of ulcerative colitis [J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2016, 26(4): 629-640.

[4] 于海食,洪纓,王玉蓉. 溃疡性结肠炎的中西药物治疗概况 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(35): 3979-3983.

[5] 王新月,王建云. 溃疡性结肠炎中医药治疗的关键问题与优势对策 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2): 263-267.

[6] 朱磊,沈洪,顾培青,等. 沈洪教授治疗溃疡性结肠炎的经验探析 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 2381-2383.

[7] 贺海辉,沈洪,郑凯,等. 清肠化湿方治疗溃疡性结肠炎活动期湿热内蕴证的疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(12): 1598-1601.

[8] 张涛,谢建群. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(4): 240-242.

[9] 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 TLR-4、NF- $\kappa$ B p56 蛋白表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2010, 19(1): 99-101.

[10] 翟金海,沈洪,倪菲菲,等. 清肠化湿方对实验性大鼠结肠炎结肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白 claudin-1 的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(3): 151-154.

[11] Bell C J, Gall D G, Wallace J L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis [J]. Am J Physiol, 1995, 268(4): 622-630.

[12] Dieleman L A, Palmén M J, Akol H et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114(3): 385-391.

[13] Fromowitz F B, Voila M V, CHAO S, et al. Rasp 21 expression in the progression of breast cancer [J]. Human Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.

[14] Haller D, Holt L, Parlesak A, et al. Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced nuclear factor-kappaB activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells [J]. Immunology, 2004, 112(2): 310-320.

[15] Forloni M, Albin S, Limongi M Z, et al. NF-kappaB, and not MYCN, regulates MHC class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells

- [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(3): 916-924.
- [16] Jena G, Trivedi P P, Sandala B. Oxidative stress in ulcerative colitis: an old concept but a new concern [J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(11): 1339-1345.
- [17] Seril D N, LIAO J, YANG G Y, et al. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(3): 353-362.
- [18] Amirshahrokhi K, Bohlooli S, Chinifroush M M. The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat [J]. *Toxicol Appl Pharma*, 2011, 253(3): 197-202.
- [19] 欧阳艳琼. 氧化应激和炎症反应在子痫前期中的作用及其相互关系的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [20] LI X, XU Y, ZHANG C, et al. Protective effect of calculus bovis sativus on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015(3): 1-8.
- [21] Sklyarow A Y, Panasyuk N B, Fomenko I S. Role of nitric oxidesynthase and cyclooxygenase/lipooxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2011, 62(1): 65-73.
- [22] 张榕, 施茵, 关鑫. GH-SOCS2-IGF-1 轴对溃疡性结肠炎肠黏膜屏障的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(23): 2442-2447.
- [23] LI Z, ZHANG D K, YI W Q, et al. NF-kappaB p65 antisense oligonucleotides may serve as a novel molecular approach for the treatment of patients with ulcerative colitis [J]. *Arch Med Res*, 2008, 39(8): 729-734.
- [24] LI J H, YU J P, YU H G, et al. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2005, 2005(4): 185-193.
- [25] YU M, SU L L, ZOU L, et al. An essential function for bata-arrestin2 in the inhibitory signaling of natural killer cells [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(8): 898-907.
- [26] Takako K, Tetsuya I, Takuya S, et al.  $\beta_2$ -adrenergic receptor regulates Toll-like receptor 4-induced nuclear factor-kappaB activation through  $\beta$ -arrestin 2 [J]. *Immunology*, 2008, 124(3): 348-356.
- [27] 王怡薇, 张会会, 王彦礼, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 NF- $\kappa$ B p65 调控作用研究 [J]. *药学报*, 2015, 50(1): 21-27.
- [28] WANGY D, TANX Y, ZHANG K. Correlation of plasma MMP-1 and TIMP-1 levels and the colonic mucosa expressions in patients with ulcerative colitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2009, 2009(37): 271-287.
- [29] Annahazi A, Molnar T, Farkas K, et al. Fecal MMP-9: a new noninvasive differential diagnostic and activity marker in ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(2): 316-320.
- [30] 蔺晓源, 余星, 雷贵玥, 等. 健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 HSP70 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(22): 91-96.

[责任编辑 全燕]