

# 黄连-干姜提取物对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

闫曙光<sup>1</sup>, 惠毅<sup>1</sup>, 李倩<sup>1</sup>, 李京涛<sup>2</sup>, 魏海梁<sup>2\*</sup>

(1. 陕西中医药大学 基础医学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西中医药大学 附属医院, 陕西 咸阳 712000)

**[摘要]** **目的:** 观察中药黄连、干姜的主要成分黄连素和 6-姜烯酚对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞炎症信号通路 Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的影响。**方法:** 50 只昆明种小鼠随机分为正常组, 模型组, 黄连素组 (100 mg·kg<sup>-1</sup>), 6-姜烯酚组 (100 mg·kg<sup>-1</sup>), 6-姜烯酚合黄连素组 (200 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组 10 只。采用 2% 葡聚糖硫酸钠口服 2 周建立溃疡性结肠炎小鼠模型, 各组给予相应剂量的药物灌胃, 正常组和模型组给予等量生理盐水, 给药 20 d 后取血清及结肠组织样本, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测血清白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分别检测结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白的表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 6-姜烯酚组, 黄连素组, 6-姜烯酚合黄连素组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量显著降低 ( $P < 0.01$ ); 三组间比较, 6-姜烯酚合黄连素组作用力最强 ( $P < 0.01$ )。 **结论:** 6-姜烯酚、黄连素均能够抑制结肠组织炎症, 减轻炎症损伤, 治疗溃疡性结肠炎, 黄连素和 6-姜烯酚联合应用有显著的协同增效作用, 其机制与抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的过度活化进而调节肠道非可控性炎症有关。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎; 黄连-干姜; 黄连素; 6-姜烯酚; Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0070-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200202

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191009.1456.008.html>

**[网络出版时间]** 2019-10-09 17:23

## Effect of Coptidis Rhizoma-Zingiberis Rhizoma Extract on Colonic Epithelium TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Mice with Ulcerative Colitis

YAN Shu-guang<sup>1</sup>, HUI Yi<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, LI Jing-tao<sup>2</sup>, WEI Hai-liang<sup>2\*</sup>

(1. Basic Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Hospital Affiliated to Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of berberine and 6-shogaol, main components of Coptidis Rhizoma and Zingiberis Rhizoma, on the inflammatory signaling pathway of Toll-like receptors 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in colonic epithelial cells of mice with ulcerative colitis. **Method:** Fifty Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, berberine group (100 mg·kg<sup>-1</sup>), 6-shogaol group (100 mg·kg<sup>-1</sup>), and 6-shogaol combined with berberine group (200 mg·kg<sup>-1</sup>), with 10 mice in each group. A

**[收稿日期]** 20190616(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81403320, 81873233); 陕西中医药大学学科创新团队建设项目(2019-YL-05)

**[第一作者]** 闫曙光, 博士, 副教授, 从事中医药治疗溃疡性结肠炎的基础与临床研究, Tel: 029-38185122, E-mail: ysg2002.student@sina.com

**[通信作者]** \* 魏海梁, 副主任医师, 从事中西医结合治疗消化道疾病的基础与临床研究, Tel: 029-33321832, E-mail: 86888694@qq.com

mouse model of ulcerative colitis was established through oral administration with 2% dextroan sulfate for two weeks. Each group was given corresponding drugs by gavage, while normal group and model group were given equal amount of normal saline. Serum and colon tissue samples were taken 20 days after administration. Enzyme-linked immunosorbent method was used to detect serum interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expressions, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot method were used to detect TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein expressions in colon epithelial tissue. **Result:** Compared with the normal group, relative expressions of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein were increased in the model group ( $P < 0.01$ ), and the contents of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, relative expressions of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein were significantly decreased in 6-shogaol group, berberine group and 6-shogaol combined with berberine group ( $P < 0.01$ ), and the contents of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Among the three groups, 6-shogaol combined with berberine group had the strongest effect ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Both 6-shogaol and berberine can inhibit colonic inflammation, reduce inflammatory damage and treat ulcerative colitis. The combined application of 6-shogaol and berberine has a significant synergism effect. The mechanism is related to the excessive activation of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway and the regulation of non-controllable intestinal inflammation.

**[Key words]** ulcerative colitis; Coptidis Rhizoma-Zingiberis Rhizoma berberine; 6-shogaol; Toll-like receptors 4 (TLR4) /nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway

溃疡性结肠炎(UC)是一种反复发作的肠道免疫炎症性疾病,是由多种因素刺激导致的机体免疫反应异常,免疫系统过度活化,产生自身抗体进而激活补体系统,放大炎症反应,释放过量炎症介质,导致非可控性炎症,引起肠黏膜组织的持续损伤,因此抑制免疫炎症是治疗溃疡性结肠炎的核心<sup>[1]</sup>。Toll样受体 4 (TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路是参与肠道免疫炎症反应的“明星通路”,该通路的活化是多种免疫细胞发挥免疫活性并释放大量炎症介质的主要物质基础,但过度的活化则导致了炎症反应处于非可控状态,引起组织的持续损伤,导致疾病迁延难愈,因此该通路也成为 UC 治疗研究中的热点<sup>[2-4]</sup>。

寒热并用法是中医药治疗 UC 临床常用治法之一<sup>[5-7]</sup>,干姜-黄连是体现寒热并用法的主要药对,该药对具有抑制免疫炎症,治疗 UC 的作用<sup>[8]</sup>。研究表明干姜的有效成分 6-姜烯酚和黄连的有效成分黄连素均是抑制炎症反应的有效单体<sup>[9-10]</sup>。为进一步明确两种单体配伍后抑制肠道免疫炎症的作用和机制,课题组开展了黄连素,6-姜烯酚单独和联合应用对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路影响的实验研究,揭示其作用和机制,为寒热药物并用提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性昆明种小鼠 50 只,体质量(20  $\pm$  5) g,由西安交通大学医学院实验动物中心提

供,动物合格证号 SCXK(陕)2012-003,动物饲养和实验均在陕西中医药大学医学科研实验中心进行,该实验经陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 药品及试剂** 6-姜烯酚(纯度 98%,宝鸡市辰光生物科技有限公司,批号 17073001);黄连素(纯度 98%,宝鸡市辰光生物科技有限公司,批号 17072601);葡聚糖硫酸钠(DSS)(美国 MP Biomedicals 公司,批号 160110);肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(美国 R&D 公司,批号分别为 340104,340116);RNA 提取试剂盒,cDNA 反转录试剂盒,PCR 检测试剂盒,蛋白 Marker,蛋白免疫印迹法(Western blot)试剂盒发光液,BCA 蛋白测定试剂盒,Loading buffer(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为 ET111-01, AT311-02, AD101-12, BM111-01, DW101-02, DQ111-01, DL101-02);5 倍 Tris-甘氨酸电泳缓冲液,10 倍电转液,10 倍 TBST, RIPA 蛋白裂解液,脱脂奶粉,苏木素-伊红(HE)染色试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 T1070, D1060, T1081, ROO20, LP0031B, G1121);TLR4, NF- $\kappa$ B p65 一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-1021R, bsm-32305R); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗,羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程公司,批号分别为 BA2305, BM3894)。

**1.3 仪器** TL988-IV 型 IANLONG Real-time PCR

System(西安天隆科技有限公司);4-20R 型 4 ℃ 离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司);DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司);YT-CJ-1ND 型超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司);ELX808 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);ZY5 型 Western blot 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);T10 型组织匀浆机(德国 IKA 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及处理** 实验动物按体质量大小排序编号后,随机分为正常组,模型组,6-姜烯酚组,黄连素组,6-姜烯酚合黄连素组。小鼠溃疡性结肠炎模型建立参考文献方法<sup>[11]</sup>。模型组,6-姜烯酚组,黄连素组,6-姜烯酚合黄连素组用相对分子质量为 36 000~50 000 的 DSS 配置成 2% 浓度的水溶液不限量自由饮用,出现稀便,黏液脓血便为造模成功。2 周后开始灌胃给药,黄连素按照参考文献剂量<sup>[12]</sup>给药,因黄连-干姜药对临床应用多剂量相等,故 6-姜烯酚给药剂量等同于黄连素,6-姜烯酚组及黄连素组分别给予 6-姜烯酚、黄连素 100 mg·kg<sup>-1</sup>;6-姜烯酚合黄连素组给予黄连素和 6-姜烯酚共 200 mg·kg<sup>-1</sup>,模型组和正常组均给予等量生理盐水,每日 1 次,给药持续 20 d。

**2.2 HE 染色观察结肠组织形态学变化** 取结肠组织,10% 甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色观察结肠组织形态学变化。

**2.3 ELISA 检测血清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  含量** 末次给药后,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,心脏采血,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,分离血清,ELISA 法检测血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

**2.4 Western blot 检测结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达** 刮取结肠上皮组织,研钵粉碎,加入 RIPA 缓冲液, PMSF 后匀浆,12 000 r·min<sup>-1</sup> 15 min 离心,取上清液;BCA 法测各组织样本蛋白浓度,根据浓度调整体积至各样本蛋白上样量一致,根据蛋白溶液体积加入等量 5 倍上样缓冲液,上样前将样品 100 ℃ 煮沸 5 min 变性;SDS-PAGE 电泳,根据标记蛋白位置切下含 36 kDa GAPDH 和 21 kDa Racl 在内的胶;转膜,加入 5% 脱脂牛奶封闭液,37 ℃ 摇床上孵育封闭 1 h,加入脱脂牛奶稀释过的一抗(1:1 000),4 ℃ 摇床孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min;二抗工作液孵育(1:5 000),室温下摇床孵育 1 h,TBST 漂洗膜 2 次,每次 10 min;进行化学发光反应,显影,拍照,分析数据。

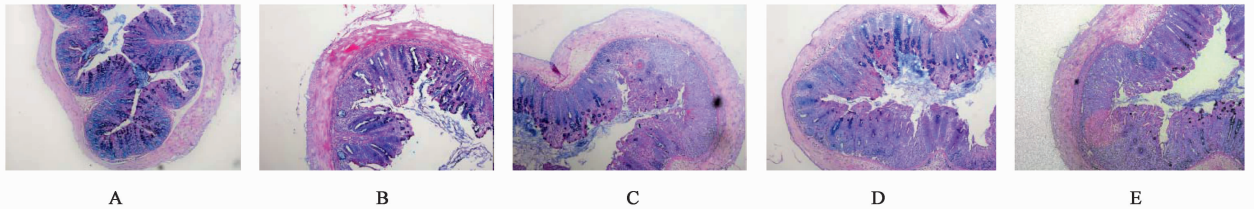
**2.5 Real-time PCR 检测结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达** 取结肠上皮组织 100 mg,加入组织裂解液 1 mL 制成组织匀浆,提取总 RNA。取总 RNA 2  $\mu$ L 按照反转录试剂盒说明书方法合成 cDNA,合成后测定 cDNA 浓度,备用。PCR 法检测 mRNA 表达。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司设计合成,选用  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参基因,TLR4 上游引物 5'-GCCGAAAG TTATTGTGCTG-3',下游引物 5'-ATGGGTTT TAGG CGCAGAGTT-3',片段长度 20 bp;NF- $\kappa$ B p65 上游引物 5'-GGGCATGCGTTTCCGTTACA-3',下游引物 5'-ATGTGGATGAGCCGGTGAG-3',片段长度 20 bp; $\beta$ -actin 上游引物 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTTC-3',下游引物 5'-CAGCACTGTGTGGCATAACA-3',片段长度 20 bp,反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 30 个循环 72 ℃ 终末延伸 10 min。相对定量法计算各指标 mRNA 的 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  值。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据的整理分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多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 UC 小鼠结肠组织病理学的影响** 正常组小鼠结肠组织结构正常,腺体排列整齐,结肠上皮组织完整、黏膜光滑,无缺损,黏液层正常。模型组小鼠结肠组织结构异常,腺体排列紊乱,部分腺体萎缩、破坏甚至丢失,黏液层部分丢失,黏膜表面出现缺损,受损部位可见炎细胞浸润、聚集。6-姜烯酚组小鼠结肠组织结构基本恢复正常,黏膜缺损明显减轻,受损部位炎细胞浸润减少。黄连素组小鼠结肠组织结构基本正常,黏膜下层仍可见大量充血,黏膜缺损减轻,但腺体排列依旧紊乱,受损部位炎性细胞减少,黏液层尚未恢复。6-姜烯酚合黄连素组结肠组织结构基本恢复正常,黏膜缺损逐渐修复,炎细胞浸润显著减少,黏液层逐渐恢复。见图 1。

**3.2 对 UC 小鼠的结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 相对表达量显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,6-姜烯酚组,黄连素组,6-姜烯酚合黄连素组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 相对表达量显著降低( $P < 0.01$ );与 6-姜烯酚合黄连素组比较,6-姜烯酚组、黄连素组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA



A. 正常组; B. 模型组; C. 6-姜烯酚组; D. 黄连素组; E. 6-姜烯酚合黄连素组 (图 2 同)

图 1 6-姜烯酚、黄连素对 UC 小鼠结肠组织病理学的影响 (HE, ×50)

Fig. 1 Effect of 6-shogaol and berberine on colonic histopathology of UC mice (HE, ×50)

相对表达量显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 6-姜烯酚、黄连素对 UC 小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF-κB p65 mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of 6-shogaol and berberine on relative expressions of TLR4 and NF-κB p65 mRNA in colonic epithelial tissues of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	TLR4	NF-κB p65
正常	-	1.07 ± 0.03	1.17 ± 0.04
模型	-	1.38 ± 0.02 <sup>1)</sup>	1.52 ± 0.03 <sup>1)</sup>
6-姜烯酚	100	1.21 ± 0.03 <sup>2,3)</sup>	1.32 ± 0.05 <sup>2,3)</sup>
黄连素	100	1.19 ± 0.04 <sup>2,3)</sup>	1.28 ± 0.03 <sup>2,3)</sup>
6-姜烯酚合黄连素	200	1.12 ± 0.02 <sup>2)</sup>	1.20 ± 0.03 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 6-姜烯酚合黄连素组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 2, 3 同)。

**3.3 对 UC 小鼠的结肠上皮组织 TLR4, NF-κB p65 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF-κB p65 蛋白相对表达量显著增高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,6-姜烯酚组、黄连素组、6-姜烯酚合黄连素组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF-κB p65 蛋白相对表达量显著降低 ( $P < 0.01$ );与 6-姜烯酚合黄连素组比较,6-姜烯酚组、黄连素组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF-κB p65 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2, 图 2。

表 2 6-姜烯酚、黄连素对 UC 小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF-κB p65 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of 6-shogaol and berberine on expressions of TLR4 and NF-κB p65 in colonic epithelial tissues of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	TLR4 /β-actin	NF-κB p65 /β-actin
正常	-	0.77 ± 0.07	0.78 ± 0.07
模型	-	1.48 ± 0.10 <sup>1)</sup>	1.50 ± 0.08 <sup>1)</sup>
6-姜烯酚	100	1.27 ± 0.06 <sup>2,3)</sup>	1.27 ± 0.09 <sup>2,3)</sup>
黄连素	100	1.22 ± 0.07 <sup>2,3)</sup>	1.21 ± 0.10 <sup>2,3)</sup>
6-姜烯酚合黄连素	200	0.92 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.96 ± 0.09 <sup>2)</sup>

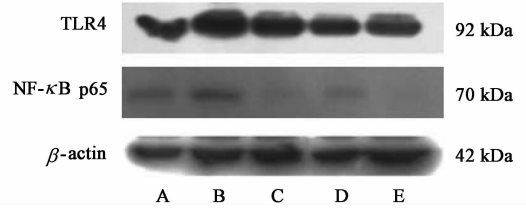


图 2 各组小鼠结肠上皮组织 TLR4, NF-κB p65 蛋白表达

Fig. 2 Changes of TLR4, NF-κB p65 proteins in each group mice colonic epithelium

**3.4 对 UC 小鼠血清 TNF-α, IL-1β 含量的影响** 与正常组比较,模型组小鼠血清 TNF-α, IL-1β 含量显著增高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,6-姜烯酚组、黄连素组、6-姜烯酚合黄连素组小鼠结肠上皮组织 TNF-α, IL-1β 含量显著降低 ( $P < 0.01$ );与 6-姜烯酚合黄连素组比较,6-姜烯酚组、黄连素组小鼠结肠上皮组织 TNF-α, IL-1β 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 6-姜烯酚、黄连素对 UC 小鼠血清 TNF-α, IL-1β 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of 6-shogaol and berberine on serum TNF-α and IL-1β in UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	TNF-α	IL-1β
正常	-	70.56 ± 16.10	68.81 ± 19.84
模型	-	311.10 ± 26.67 <sup>1)</sup>	445.40 ± 45.07 <sup>1)</sup>
6-姜烯酚	100	207.00 ± 21.66 <sup>2,3)</sup>	257.00 ± 34.75 <sup>2,3)</sup>
黄连素	100	180.80 ± 16.96 <sup>2,3)</sup>	215.50 ± 26.21 <sup>2,3)</sup>
6-姜烯酚合黄连素	200	146.70 ± 14.09 <sup>2)</sup>	143.10 ± 21.28 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

非可控性炎症是导致溃疡性结肠炎反复发作,不断进展的主要原因,因此控制炎症反应是治疗 UC 的主要策略<sup>[13]</sup>。研究表明 Toll 样受体与非可控性炎症的发生、发展密切相关<sup>[14]</sup>。Toll 样受体是存在与细胞表面的模式识别受体,主要负责对入侵的病

原微生物进行识别并将信号转导至下游启动固有免疫进程,同时 Toll 样受体亦是固有免疫和特异性免疫之间的桥梁,处于细胞表面的 Toll 样受体能触发细胞内的信号传导,促使细胞释放大量炎症因子,适度的炎症反应对机体是有利的,有助于机体快速而有效地清除各种病原微生物及潜在的危险,一旦完成异物清除及组织修复后炎症将适时终结,所以炎症是机体应对病原体感染和多种损伤因子产生的防御反应,是机体保持健康的重要条件<sup>[15]</sup>。炎症反应过轻将无法清除病原微生物导致机体长期处于感染状态,过重的炎症反应则会引起机体损伤。而溃疡性结肠炎的发生正是由于病原体的大量入侵,Toll 样受体过度活化,激活免疫细胞启动异常免疫反应,免疫细胞在清除病原体的过程中释放过量促炎因子,导致肠道长期处于非可控性炎症状态,进一步加剧黏膜屏障的破坏<sup>[12]</sup>。目前,在哺乳动物及人类中已经发现的人 TLRs 家族成员有 11 个,其中了解比较清楚的与溃疡性结肠炎发病关系比较密切的主要有 TLR2,TLR4 和 TLR9<sup>[16]</sup>,其中 TLR4 是目前研究的热点,临床研究发现我国 UC 患者结肠上皮组织细胞中 TLR4 及其下游 NF- $\kappa$ B 表达显著上调<sup>[17]</sup>。细胞表面的 TLR4 触发细胞内信号的传导,通过关键效应蛋白髓系分化因子 88,IL-1 受体相关激酶、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 等进行上下游信号传递,最终激活 NF- $\kappa$ B,其亚基 NF- $\kappa$ B p65 被磷酸化后会释放 TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-6 和 IL-10 等炎症因子,这些物质会促进细胞的增殖和修复,但过度活化 NF- $\kappa$ B 则会引起炎症介质和细胞因子过度释放,最终形成非可控性炎症,使 UC 不可避免的发生,持续的炎症阻碍了黏膜的再生,导致组织损伤,并最终使疾病朝着炎-癌转化的方向发展<sup>[18-19]</sup>。因此 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路也成为防治溃疡性结肠炎及防止炎-癌转化的重要治疗靶点。

干姜-黄连是在中医寒热并用法指导下的治疗 UC 常用药对之一,是众多治疗 UC 的寒热并用方剂的主要组成药物,单纯从药物的寒热药性分析,寒热并用似乎是矛盾的,但在实际应用中寒热药物并用却表现出了良好的治疗效果,从传统医学的角度很难阐明寒热药物并用的科学意义,而从现代医学的角度,通过药物的有效单体之间的组分配伍则能更直观的说明寒热药物并用的意义。实验研究表明 6-姜烯酚是干姜发挥药效的主要活性成分之一,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抑制血管平滑肌增殖<sup>[20-23]</sup>等多重效应;黄连素是已经应用于临床治疗肠道炎

症性疾病的有效药物<sup>[24]</sup>,近年来研究发现其在能够降血脂保护心血管、通过影响大脑内神经递质发挥抗焦虑作用、增加胰岛素敏感性来治疗糖尿病,这些结果提示该药物在预防和治疗心脑血管疾病、糖尿病、消化道疾病等重大疾病方面有着不可低估的应用前景<sup>[25-26]</sup>。这两种单体均具有抗炎的作用,两者联合应用后会产生什么样的效果呢?本此实验结果表明,黄连素,6-姜烯酚,黄连素联合 6-姜烯酚均能有效调节肠道上皮组织 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的过度活化,通过抑制 TLR4 受体的表达进而抑制 NF- $\kappa$ B 蛋白的磷酸化,减少下游 TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$  等炎症因子的释放,最终达到控制炎症反应的作用,其中黄连素联合 6-姜烯酚的作用要明显高于黄连素,6-姜烯酚的单独应用,表现出了显著的协同增效作用。

综上所述,黄连素,6-姜烯酚分别是黄连、干姜的治疗 UC 的有效成分之一,这 2 种有效成分均具有抑制免疫炎症反应的作用,其药理机制与调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的过度活化有关,这两种有效成分的联合应用表现出了显著的协同增效作用,这也部分揭示了寒热药物配伍治疗 UC 的科学内涵。

#### [参考文献]

- [1] Shalkami A S, Hassan M, Bakr A G. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(2):78-86.
- [2] 王移飞,王凤仪,徐兰萍,等.芍药汤经 HMGB<sub>1</sub> 调节湿热型溃疡性结肠炎大鼠 MyD88 和 NF- $\kappa$ B 的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12):86-91.
- [3] Chaniotou Z, Giannogonas P, Theoharis S, et al. Corticotropin-releasing factor regulates TLR4 expression in the colon and protects mice from colitis [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6):2083-2092.
- [4] 钟宇,郑学宝,叶华,等.芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(7):1450-1456.
- [5] 刘玉珠,徐芳,熊腊根.“通调气血,寒热并用”法结合西药治疗溃疡性结肠炎的疗效观察[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2015, 23(7):493-495.
- [6] 真登辉.基于知网文献研究中药物治疗 UC 的临床用药规律[D].沈阳:辽宁中医药大学,2016.
- [7] 郭雁冰.中医药抗溃疡性结肠炎复发的研究[D].北京:北京中医药大学,2006.
- [8] 李阳,郝艺照,傅熠俊,等.黄连-干姜药对预防 DSS 诱导的小鼠结肠炎作用及其机制[J]. *中国实验方剂*

- 学杂志, 2017, 23(15):162-167.
- [ 9 ] Sohn Y, HAN N Y, Lee M J, et al. [ 6 ]-Shogaol inhibits the production of proinflammatory cytokines via regulation of NF- $\kappa$ B and phosphorylation of JNK in HMC-1 cells [ J ]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2013, 35(4):462-470.
- [ 10 ] LI Y H, XIAO H T, HU D D, et al. Berberine ameliorates chronic relapsing dextran sulfate sodium induced colitis in C57BL/6 mice by suppressing Th17 responses [ J ]. Pharmacol Res, 2016, 110:227-239.
- [ 11 ] 付敏军, 石荣珍, 沈建君, 等. 新麦纤散对 DSS 诱导 UC 大鼠的治疗作用及机制分析 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5):126-130.
- [ 12 ] 李阳, 郝艺照, 傅熠俊, 等. 黄连素预防葡聚糖硫酸钠诱导溃疡性结肠炎的作用机制 [ J ]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8):3431-3435.
- [ 13 ] Lange K M D, Moutsianas L, Lee J C, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease [ J ]. Nat Genet, 2017, 49(2):256-261.
- [ 14 ] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [ J ]. Nat Immunol, 2010, 11(5):373-384.
- [ 15 ] Mantovani A. Cancer: inflaming metastasis. [ J ]. Nature, 2009, 457(7225):36-37.
- [ 16 ] TAN Y, ZOU K F, QIAN W, et al. Expression and implication of Toll-like receptors TLR2, TLR4 and TLR9 in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis [ J ]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2014, 34(5):785-790.
- [ 17 ] YU Z H, HUANG F, XU N, et al. Expression of Toll-like receptor 4, CD14, and NF- $\kappa$ B in Chinese patients with ulcerative colitis [ J ]. J Immunoassay Immunochem, 2011, 32(1):47-56.
- [ 18 ] Szumilas D, Krysiak R, Okopień B. The role of TLR4 receptor in development of inflammation and carcinogenesis in ulcerative colitis and pharmacotherapy of this disorder [ J ]. Wiad Lek, 2013, 66(1):3-9.
- [ 19 ] Setia S, Nehru B, Sanyal S N. Activation of NF- $\kappa$ B: bridging the gap between inflammation and cancer in colitis-mediated colon carcinogenesis [ J ]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(1):119-128.
- [ 20 ] Kim M O, Lee M H, Oi N, et al. [ 6 ]-Shogaol inhibits growth and induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells by directly regulating Akt1/2 [ J ]. Carcinogenesis, 2014, 35(3):683-691.
- [ 21 ] Annamalai G, Kathiresan S, Kannappan N. [ 6 ]-Shogaol, a dietary phenolic compound, induces oxidative stress mediated mitochondrial dependant apoptosis through activation of proapoptotic factors in Hep-2 cells [ J ]. Biomed Pharmacother, 2016, 82:226-236.
- [ 22 ] 王婧超. 6-姜烯酚通过 NF- $\kappa$ B 途径对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的保护作用机制研究 [ D ]. 广州:南方医科大学, 2016.
- [ 23 ] LIU R, Heiss E H, Sider N, et al. Identification and characterization of [ 6 ]-shogaol from ginger as inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation [ J ]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59(5):843-852.
- [ 24 ] YU X T, XU Y F, HUANG Y F, et al. Berberine attenuates mucosal lesions and inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice [ J ]. PLoS One, 2018, 13(3):e0194069.
- [ 25 ] 李骋, 何金枝, 周学东, 等. 黄连素调控胰岛素抵抗相关 2 型糖尿病的研究进展 [ J ]. 中国中药杂志, 2017, 42(12):2254-2260.
- [ 26 ] 胡诚毅, 莫志贤. 黄连素的药理作用及机制研究进展 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20):221-227.

[责任编辑 周冰冰]