

· 经典名方 ·

芍药汤对大肠湿热型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 CD14, FADD, Caspase-8 表达的影响

曹思齐¹, 王凤仪^{1,2*}, 汤胜男¹, 赵党生^{1,2}, 李洋洋¹, 刘志杰¹, 柴瑞婷¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;

2. 深圳市宝安纯中医治疗医院, 广州 深圳 518101)

[摘要] 目的: 观察芍药汤对大肠湿热型溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠血清中细胞黏附分子-1(ICAM-1), 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)含量及病灶结肠组织中白细胞分化抗原14(CD14), Fas相关死亡结构域蛋白(FADD)与天冬半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8) mRNA及蛋白表达的影响。方法: 将SPF级Wistar大鼠80只随机分为正常组10只、造模组70只, 采用病证结合的方式复制大肠湿热型UC大鼠, 即高脂高糖辛辣饮食+2,4-二硝基苯磺酸(DNBS)结合乙醇复合法造模, 造模成功后, 按随机数字表法将造模组分为模型组、柳氮磺吡啶(SASP)组及芍药汤低、中、高剂量组, 每组14只, 给予柳氮磺吡啶 $0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 芍药汤低、中、高剂量($6, 12, 24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃, 正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃, 连续21 d。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清ICAM-1, TGF- β_1 含量, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测结肠组织CD14, FADD, Caspase-8 mRNA表达, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织CD14, FADD, Caspase-8蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠血清中ICAM-1含量明显升高, TGF- β_1 含量明显降低($P<0.05$); CD14, FADD, Caspase-8 mRNA及蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$)。与模型组比较, 芍药汤中、高剂量组及SASP组大鼠血清中ICAM-1含量明显降低, 而芍药汤低、中、高剂量组及SASP组大鼠血清中TGF- β_1 含量明显升高($P<0.05$); 各干预组CD14, FADD, Caspase-8 mRNA及蛋白表达量明显降低($P<0.05$), 并以芍药汤高剂量组及SASP组更为明显。结论: 芍药汤对大肠湿热型UC大鼠具有一定干预作用, 其机制可能与抑制CD14, FADD及Caspase-8 mRNA及蛋白的表达有关。

[关键词] 芍药汤; 溃疡性结肠炎; 白细胞分化抗原14(CD14); Fas相关死亡结构域蛋白(FADD); 天冬半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)05-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202401

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20201119.1539.003.html>

[网络出版日期] 2020-11-19 17:01

Effect of Shaoyaotang on Expressions of CD14, FADD and Caspase-8 in Colonic Tissues of Rats with Large Intestinal Damp-heat Syndrome of Ulcerative Colitis

CAO Si-qi¹, WANG Feng-yi^{1,2*}, TANG Sheng-nan¹, ZHAO Dang-sheng^{1,2}, LI Yang-yang¹, LIU Zhi-jie¹, CHAI Rui-ting¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Shenzhen Baoan Hospital of Pure Chinese Medicine Treatment, Shenzhen 518101, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shaoyaotang on the contents of cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in serum of large intestine damp-heat syndrome of ulcerative colitis (UC) in rats, and the gene and protein expressions of leukocyte differentiation antigen14

[收稿日期] 20201013(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8156150228)

[第一作者] 曹思齐, 在读硕士, 从事中医四诊及病证合参临床应用研究, E-mail: 382983532@qq.com

[通信作者] * 王凤仪, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中医四诊理论研究与分析工作, E-mail: wfy@gszy.edu.cn

(CD14), Fas-related death domain protein (FADD) and cysteinyl aspartate specific protease-8 (Caspase-8) in the focal colon tissue. **Method:** A total of 80 SPF Wistar rats were randomly divided into the blank group ($n=10$) and modeling group ($n=70$). The large intestine damp-heat syndrome of UC rats was replicated by the combination of disease and syndrome, which was high-fat, high-sugar and spicy diets combined with 2, 4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) and ethanol. After successful modeling, the modeled groups were divided into model group, sulfasalazine (SASP) control group, and low, medium and high-dose Shaoyatong groups by the method of random number table, with 14 rats in each group. Low, medium and high doses of Sulfasalazine $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and Shaoyatong (6, 12, 24 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) were given by gavage. The blank group and the model group were given equal volume of normal saline for 21 days. The contents of serum ICAM-1 and TGF- β_1 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expressions of CD14, FADD and Caspase-8 mRNA in colon tissues were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the expressions of CD14, FADD and Caspase-8 protein in colon tissues were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the serum ICAM-1 level in the model group were significantly increased, whereas the content of TGF- β_1 were significantly decreased ($P<0.05$). The relative expression levels of CD14, FADD, Caspase-8 mRNA and protein were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the content of ICAM-1 in the serum of the rats in the medium, high-dose Shaoyatong groups and the SASP group were significantly decreased, while the content of TGF- β_1 in the serum of the rats in the low, medium, high-dose Shaoyatong groups and the SASP group were significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of CD14, FADD, Caspase-8 mRNA and protein in each intervention group were significantly decreased ($P<0.05$), especially in the high-dose Shaoyatong group and the SASP group. **Conclusion:** Shaoyatong has a certain intervention effect on UC rats with large intestine damp-heat syndrome, and its mechanism may be related to the inhibition of CD14, FADD and Caspase-8 genes and proteins expression.

[Key words] Shaoyatong; ulcerative colitis; leukocyte differentiation antigen 14 (CD14); Fas-related death domain protein (FADD); cysteinyl aspartate specific protease-8 (Caspase-8)

溃疡性结肠炎(UC)是一种非特异性慢性炎症性肠道疾病,病变累及直肠、结肠的不同部位,以反复发作的腹痛、腹泻、黏液脓血便为主要临床表现,严重影响患者的生活质量^[1]。目前认为UC的发生、发展主要与遗传、环境、肠道微生物、免疫、感染及心理因素等相关^[2-3]。而免疫因素作为UC发病的重要机制之一,被广泛持续关注。白细胞分化抗原14(CD14)与脂多糖(LPS)/脂多糖结合蛋白(LBP)相互作用后,可激活Toll样受体4(TLR4),进而激活TLR4/髓样分化因子88(MyD88)通路,激活后的MyD88可与Fas相关死亡结构域蛋白(FADD)结合并活化天冬半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8),张国霞等^[4]证明TLR4激活后可按照MyD88/FADD/Caspase-8途径介导细胞凋亡。LI等^[5]研究表明结肠上皮细胞的过度凋亡会促使UC发病。

UC属于中医“泄泻”“肠澼”“休息痢”等范畴,病机复杂,多由禀赋不足、饮食不节、情志所伤等导致脾胃受损、湿热毒邪郁结于大肠而发病。研究表明湿热是疾病活动的重要诱发因素,也是UC反复

发作、缠绵难愈的重要原因^[6]。芍药汤出自金·刘完素《素问病机气宜保命集》,依经之言:“溲而便脓血,气行而血行,行血则便脓自愈,调气则后重自除。”芍药汤作为古方在既往研究中显示对湿热型UC患者有一定的缓解作用^[7-8],且在本课题组前期实验研究中,王移飞等^[9]发现,芍药汤可能通过调控高迁移率族蛋白B1(HMGB1)来抑制Toll样受体(TLRs)通路中MyD88和核转录因子- κ B(NF- κ B)的表达,以及徐敏等^[10]发现,芍药汤能降低TLR4,核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)和促炎因子白细胞介素-6(IL-6)基因和蛋白的表达,故本研究建立大肠湿热型UC大鼠模型,以芍药汤进行干预治疗,进一步观察芍药汤对大肠湿热型UC大鼠血清中细胞黏附分子-1(ICAM-1),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)含量,结肠病灶组织中CD14,FADD与Caspase-8的基因及蛋白表达影响,探讨芍药汤干预UC作用机制,以期芍药汤治疗大肠湿热型UC提供新的科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康Wistar大鼠80只,雌雄各40只,体质量(180±20)g,由甘肃中医药大学实验中心提供,伦理审查编号NO.0000438;合格证号NO.0001404。本研究经甘肃中医药大学伦理委员会批准(批号2019-155)。

1.2 药物及制备 芍药汤据2015年版《中华人民共和国药典》方法炮制,按比例配伍(由白芍-黄连-黄芩-槟榔-官桂-大黄-当归-木香-炙甘草4:2:2:1:1:1:2:1:1),由甘肃中医药大学附属医院药剂科制剂室加工,使药液加热浓缩至每1 mL药液含生药4g(由甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定合格)。芍药汤低、中、高剂量组按60 kg体质量成人每日用量的2,5,10倍分别予6,12,24 g·kg⁻¹·d⁻¹煎剂灌胃,柳氮磺吡啶(SASP,上海信谊天平药业有限公司产品,批号09190104)按60 kg体质量成人每日用量的5倍量0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,模型组及正常组给予连续21 d等体积生理盐水灌胃。

1.3 试剂 2,4-二硝基苯磺酸(DNBS),苏木素(美国Sigma公司,批号分别为STBH2928, H9627);十二烷基硫酸钠(SDS,国药集团化学试剂有限公司,批号30166428);无水乙醇(德州亿乐消毒科技有限公司,批号20190402);水合氯醛(天津富宇精细化工有限公司,批号20160410);猪油、白酒(江苏南顺食品有限公司,执行标准号均为Q/YH0001S);CD14抗体,FADD抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为17000-1-AP, 14906-1-AP);Caspase-8抗体(北京博奥森生物技术有限公司,货号bsm-33190M);内参β-肌动蛋白(β-actin)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠,羊抗兔的二抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号分别为BM0627, BA1051, BA1054);ICAM-1, TGF-β₁酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏麦莎实业有限公司,货号分别为MS-0199R2, MS-0181R2);SYBR Green PCR试剂盒,逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,货号分别为R101-01/02, Q111-02);蛋白Marker(广州泛思生物科技有限公司,货号26619-1);ECL底物液(美国赛默飞世尔科技有限公司,货号NCI5079);显影定影试剂盒(天津市汉中摄影材料厂);X射线胶片(美国柯达公司,货号XBT-1);伊红Y(水溶性)(国药集团药业股份有限公司,货号71014544);trizol(美国Ambion公司,货号15596-026)。

1.4 仪器 Quant Studio 6型实时荧光定量聚合酶

链式反应(Real-time PCR)仪(美国应用生物系统公司);DHG 9203A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);JY300型水平电泳仪,JY02S型紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司);Nano-100型微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司);JT-12J电脑生物组织脱水机(武汉俊杰实业集团有限公司);RM 2016轮转式切片机(德国Leica公司);BX53型生物显微镜(日本奥林巴斯公司);Power Pac型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将SPF级Wistar大鼠80只随机分为正常组10只、造模组70只,造模成功后,按随机数字表法将造模组分为每组14只的芍药汤低、中、高剂量组、模型组及SASP组。

2.2 造模方法 大肠湿热模型复制^[11],高糖高脂及辛辣饮食+2,4-二硝基苯磺酸(DNBS)结合乙醇复合方法造模,随机抽取10只Wistar大鼠,雌、雄各半,作为正常组,普通固体饲料喂养,自由饮水。剩余70只为复合造模组,采用高糖高脂辛辣饮食法,即普通饲料喂养,自由饮用质量浓度200 g·L⁻¹的蜂蜜水,隔日按大鼠体质量灌服油脂15 g·kg⁻¹,并与油脂隔日按20 mL·kg⁻¹灌服52%白酒,交替灌服20 d。

UC模型复制^[12-13],在确认大肠湿热证候模型成功复制后,在第21天,各组大鼠禁食不禁水24 h后用10%水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,将直径2~3 mm的硅胶管由肛门轻柔插入约4 cm处,注入18% DNBS乙醇溶液0.25 mL(0.25 mL 50%乙醇中含DNBS 45 mg),捏紧肛门,倒置1 min。正常组同方法注入生理盐水0.25 mL。

2.3 给药方法及标本采集 造模成功第21天后,正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃,芍药汤低、中、高剂量组及SASP组按1.2项所述连续给药21 d,末次给药后,禁食不禁水24 h后麻醉脱颈处死,在低温下迅速剖取肛门上约8 cm的结肠组织,以生理盐水或磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,滤纸吸干,纵向切开一部分结肠放于4%的多聚甲醛中密封避光4℃保存,将另一部分则置于无酶冻存管-80℃保存等待检测。

2.4 指标检测及方法

2.4.1 观察指标 一般状况观察指标包括每日仔细观察各组大鼠的精神状态、饮食、活动、大便等情况,并做好记录。结肠黏膜大体观察则将甲醛固定后的结肠标本肠黏膜层向上平铺于洁净板上,用大头针固定,并保持于0.9%氯化钠溶液中,观察黏膜

损伤程度。

2.4.2 苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理变化 4%的多聚甲醛密封避光保存结肠组织,常规石蜡包埋组织标本、切片后进行HE染色,光镜观察组织学改变。

2.4.3 ELISA检测各组大鼠血清中ICAM-1, TGF- β_1 含量 将麻醉后的大鼠进行心脏采血, 3 000 r·min⁻¹离心15 min后吸取上清放置于4℃备用;按照试剂说明书步骤检测大鼠血清中ICAM-1, TGF- β_1 含量。将试剂盒与待测血清平衡至室温,准确布板,加样,37℃温育,洗涤、显色、终止反应,所有加样孔均进行3次重复。酶标仪测定450 nm波长时各孔吸光度 A ,绘制标准曲线,计算样品含量。

2.4.4 Real-time PCR检测各组大鼠结肠黏膜组织中CD14, FADD, Caspase-8 mRNA的表达 取新鲜冰冻结肠组织100 mg,采用trizol法提取总RNA,使用微量分光光度计测定 A ,计算RNA的纯度及浓度。按试剂盒说明将RNA书将其逆转录为互补的cDNA,PCR引物由北京擎科生物科技有限公司合成,其中CD14引物序列为上游5'-GAAAGTG TCCGCTGCTACTG-3',下游5'-CCAGATTTGCTT CCGTGTCC-3',扩增片段长度为151 bp;FADD引物序列为上游5'-TGTGTGACAATGTGGGAGA-3',下游5'-GGCGTTCTCCTTCTCGACAT-3',扩增片段长度为158 bp;Caspase-8引物序列为上游5'-AACATGCGGGACAGAAAAGG-3',下游5'-CTT CCCATCCGTTCCGTAGA-3',扩增片段长度为222 bp; β -actin引物序列上游5'-CACGATGG AGGGCCGGACTCATC-3',下游5'-TAAAGACC TCTATGCCAACACAGT-3',扩增片段长度为240 bp。反应条件为50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,40循环。然后绘制溶解曲线,最终数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行相对表达量分析。

2.4.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠结肠黏膜组织中CD14, FADD, Caspase-8蛋白的表达 取剪碎的组织块100 mg于2 mL离心管中,每管加200 μ L单去污剂裂解液裂(含PMSF 2 μ L,磷酸酶抑制剂2 μ L),然后加入清洗干净的钢珠,使用自动匀浆机匀浆后置于冰上30 min充分裂解。12 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径8.5 cm)后取上清分装于0.5 mL离心管中并置于-20℃保存。随后使用BCA法检测蛋白浓度,制备好的样品用SDS-PAGE进行电泳、转膜、封闭,含5%脱脂奶粉的TBST洗膜,用封闭液稀释对应一抗(CD14, 1:500;

FADD, 1:500;Caspase-8, 1:2 000),将PVDF膜浸泡于一抗中,4℃过夜,然后洗涤3次。用封闭液稀释相应的HRP二抗,按比例1:5万稀释,将PVDF膜浸泡于二抗中,并37℃摇床孵育2 h,洗涤。将ECL显色液按1:1比例混匀,均匀加在PVDF膜上,反应数分钟后滤纸吸干覆上保鲜膜,X射线胶片显影后冲洗胶片,经晾晒扫描后,用IPP-Pro Plus分析胶片灰度值。

2.5 统计学处理 采用统计软件SPSS 24.0处理;实验数用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

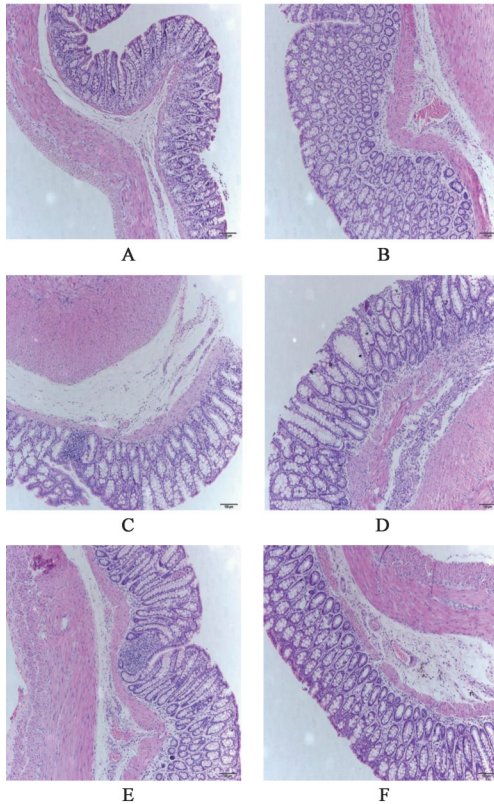
3 结果

3.1 对大鼠一般状态的影响 正常组大鼠状态佳,精神良,食纳可,毛色光亮荣润,喜活动,大便呈完整颗粒状,体质量呈上升状态。模型组大鼠,SASP组及芍药汤干预组精神萎靡,懒于活动,被毛松散无泽,食量较少,形态消瘦,拱背扎堆,造模第3~5天出现扭体反应,腹泻,肛周污秽,大便次数增多、软便或稀便、大便末端有黏液或脓点等表现。经1周药物治疗后,SASP组及高剂量组情况明显改善,仍扎堆软便,毛色无泽,模型组及中、低剂量组变化甚微。在药物干预3周后,各组大鼠一般状态均有好转,精神状态转佳,毛色较前荣润,体质量有所增长,大便多数呈散在颗粒状,以高剂量组变化最为显著。

3.2 对大肠湿热型UC大鼠结肠黏膜组织形态的影响 正常大鼠结肠黏膜组织结构完整清晰,细胞整齐排列,杯状细胞含量比较充足,肠腺细胞形态规则,无充血及水肿,血管可见;模型组结肠组织大片黏膜缺失,大量炎性细胞浸润,细胞间质间充血及血肿明显,可见形成的溃疡灶;其他各治疗组虽有不同程度的组织损伤,但结肠黏膜组织结构相对清晰,细胞排列较整齐,间质间少量充血及水肿,少量炎性细胞分布,腺体明显出现增生,基本形态与正常组无太大差别,并以芍药汤高剂量组形态最为显著。见图1。

3.3 对大肠湿热型UC大鼠血清中ICAM-1, TGF- β_1 含量表达的影响 与正常组比较,大肠湿热型UC模型大鼠血清中ICAM-1含量明显升高, TGF- β_1 含量明显下降($P<0.05$);与模型组比较,芍药汤中、高剂量组及SASP组大鼠血清中ICAM-1含量明显降低,而芍药汤低、中、高剂量组及SASP组大鼠血清中TGF- β_1 含量明显升高($P<0.05$)。见表1。

3.4 对大肠湿热型UC大鼠结肠组织中CD14, FADD, Caspase-8 mRNA表达的影响 与正常组比



A. 正常组; B. 模型组; C. 芍药汤 6 g·kg⁻¹组; D. 芍药汤 12 g·kg⁻¹组; E. 芍药汤 24 g·kg⁻¹组; F. SASP组(图2同)
图1 芍药汤对大肠湿热型UC大鼠结肠黏膜组织形态的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Shaoyao Tang on colonic tissue in morphology of syndrome UC rats(HE, ×200)

表1 芍药汤对大肠湿热型UC大鼠血清中ICAM-1, TGF-β₁含量表达的影响(̄x±s, n=6)

Table 1 Effect of Shaoyao Tang on expression of ICAM-1 and TGF-β₁ in serum of syndrome UC rats (̄x±s, n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ICAM-1	TGF-β ₁
正常		37.096±4.975	85.314±1.360
模型		47.916±0.481 ¹⁾	66.942±1.476 ¹⁾
芍药汤	6	44.186±2.048	72.100±1.053 ²⁾
	12	41.350±2.432 ²⁾	76.988±1.677 ²⁾
	24	38.640±4.604 ²⁾	80.844±2.143 ²⁾
SASP	0.2	40.898±2.956 ²⁾	78.019±1.687 ²⁾

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

较,模型组中CD14, FADD, Caspase-8 mRNA表达明显升高(P<0.05);与模型组比较, SASP组与芍药汤各剂量组中CD14, FADD, Caspase-8 mRNA表达均明显降低(P<0.05)。见表2。

3.5 对大肠湿热型UC大鼠结肠组织中CD14, FADD, Caspase-8蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组CD14, FADD, Caspase-8蛋白表达水平

明显升高(P<0.05);与模型组比较,芍药汤各剂量组及SASP组CD14, FADD, Caspase-8蛋白表达水平均降低(P<0.05),高剂量组降低最为明显。见表3,图2。

4 讨论

UC由多因素共同作用所致,中医认为湿热是活动期的主要病因病机,芍药汤具有清热燥湿、调和气血之功。此如《医方集解》有云:“此芍药汤足太阴、手足阳明药也。芍药酸寒,泻肝火,敛阴气,和营卫,故以为君;大黄、归尾破积而行血;木香、槟榔通滞而行气;黄芩、黄连燥湿而清热。盖下痢由湿热郁积于肠胃不得宣通,故大便重急,小便赤涩也。辛以散之,苦以燥之,寒以清之,甘以调之。加肉桂者,假其辛热以为反佐也。”临床观察表明该方可有效缓解UC症状。故本实验研究采取高糖高脂辛辣饮食, DNBS结合乙醇复合法复制大肠湿热型UC大鼠模型,以期探讨芍药汤促进UC愈合的药理效应及其可能的分子机制。

本课题组前期研究成果表明,通过抑制TLRs信号通路的过度激活,能够有效缓解UC的发生发展,而CD14作为一种促炎因子,与TLR4信号通路的激活关系密切,其能够与LPS高度结合并活化产生多种增强活性的前炎症因子^[14-15],促使炎症反应发生,在介导炎症性肠病中发挥关键作用^[16-17]。MyD88是TLR4介导的炎症反应中凋亡途径的重要信号分子,是与Fas相关死亡结构连接的接头蛋白^[18],故可与FADD相互作用,同时FADD能够通过死亡效应结构域(DED)来调动和活化Caspase-8,使Caspase产生级联反应,而Caspase-8作为凋亡启动因子,位于级联反应中的核心地位,可在其他蛋白辅助下,发生自我活化,最终诱发凋亡^[19]。研究表明通过抑制CD14表达可以显著减轻UC大鼠的肠道炎症反应^[20-21],相反, LPS可以诱导人结肠上皮细胞高表达FADD^[22],同时提高Caspase-8活性,引起全身性炎症反应。研究表明通过下调结肠黏膜上皮细胞凋亡关键调控酶Caspase-3, Caspase-8的表达,能够延缓肠上皮细胞凋亡,促进肠黏膜屏障修复,发挥缓解UC的效应^[23-25]。

此外UC的发病与炎症因子密切相关,抑制炎症因子分泌、促进黏膜屏障修复是缓解UC的重要方法^[26-27]。ICAM-1作为免疫球蛋白超家族的重要一员,促进细胞间与细胞基质间的黏附,其通过配体间的相互作用,可以介导不同亚群间与白细胞的黏附作用,调控细胞活性及炎性表达程度,并与内

表 2 芍药汤对大肠湿热型 UC 大鼠结肠黏膜组织中 CD14, FADD, Caspase-8 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Shaoyatong on colonic CD14, FADD, Caspase-8 mRNA of syndrome UC rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD14	FADD	Caspase-8
模型		4.679±0.341 ¹⁾	1.890±0.491 ¹⁾	2.723±0.529 ¹⁾
芍药汤	6	4.278±1.450 ²⁾	1.558±0.672 ²⁾	2.456±0.279 ²⁾
	12	3.273±0.644 ²⁾	1.425±0.515 ²⁾	1.626±0.738 ²⁾
	24	2.790±0.817 ²⁾	1.169±0.228 ²⁾	1.394±0.184 ²⁾
SASP	0.2	2.630±0.211 ²⁾	1.016±0.439 ²⁾	1.280±0.928 ²⁾

注:正常组各指标 mRNA 表达均为 1。

表 3 芍药汤对大肠湿热型 UC 大鼠结肠黏膜组织中 CD14, FADD, Caspase-8 蛋白相对达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Shaoyatong on relative expression of CD14, FADD and Caspase-8 protein in colonic mucosa tissue of syndrome UC rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD14/ β -actin	FADD/ β -actin	Caspase-8/ β -actin
正常		0.168±0.414	0.201±0.007	0.069±0.009
模型		0.538±0.676 ¹⁾	0.711±0.027 ¹⁾	0.186±0.116 ¹⁾
芍药汤	6	0.427±0.690 ²⁾	0.479±0.219 ²⁾	0.142±0.102 ²⁾
	12	0.351±0.099 ²⁾	0.300±0.033 ²⁾	0.137±0.014 ²⁾
	24	0.190±0.138 ²⁾	0.137±0.011 ²⁾	0.095±0.021 ²⁾
SASP	0.2	0.310±0.159 ²⁾	0.181±0.013 ²⁾	0.106±0.005 ²⁾

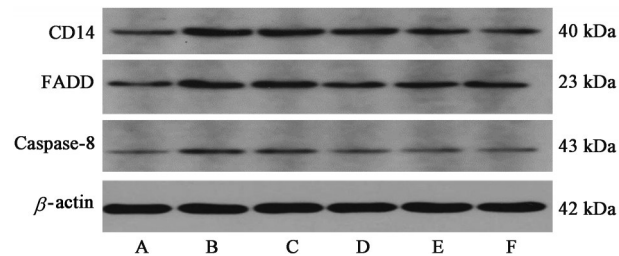


图 2 各组大鼠结肠组织 CD14, FADD, Caspase-8 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of CD14, FADD and Caspase-8 protein expression in colon of rats in each group

皮细胞发生反应,促进炎症的发生^[28-29]。TGF- β_1 是 TGF- β 的三种异构体之一,是一种广泛调节细胞增殖、分化,参与创面愈合的多肽分子,促进细胞外基质的合成与分泌,同样也是作为重要的抑炎因子,在同源性相似性方面,与其他三者相似,具有一定的趋化性,是免疫与炎性系统的参与者,而其低表达时可能会抑制炎症因子的表达水平^[30-33],二者在肠黏膜稳态环境中均发挥着重要的作用。

本研究实验研究表明大肠湿热型 UC 大鼠血清中 ICAM-1 含量明显升高, TGF- β_1 含量明显降低;在结肠黏膜组织中 CD14, FADD, Caspase-8 蛋白及 mRNA 表达明显升高,而通过芍药汤的灌胃干预后,芍药汤中、高剂量组及 SASP 组大鼠血清中 ICAM-1 含量明显降低;而芍药汤低、中、高剂量组及 SASP 组大鼠血清中 TGF- β_1 含量明显升高;芍药

汤低、中、高剂量组 CD14, FADD, Caspase-8 mRNA 及蛋白表达均下降,并且均以芍药汤高剂量组及 SASP 组调控更为显著。综上所述,基于本课题前期工作基础及本次实验研究结果显示,芍药汤具有明显的促进 UC 愈合的效应,其机制可能与 CD14 干预 TLR4 下游 FADD 及 Caspase-8 等基因介导的肠黏膜细胞凋亡以及炎症反应的发生有关。

[参考文献]

[1] FURFARO F, BEZZIO C, ARDIZZONE S, et al. Overview of biological therapy in ulcerative colitis: current and future directions[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2015, 24(2): 203-213.

[2] GRACIE D J, GUTHRIE E A, HAMLIN P J. Bi-directionality of brain-gut interactions in patients with inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology, 2018, 154(6): 1635-1646.

[3] 甄建华, 黄光瑞. 溃疡性结肠炎病因和发病机制的现代医学研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(4): 245-251.

[4] 张国霞, 周爱玲, 张贵萍, 等. 大鼠海马神经元 TLR4 介导的 MyD88 依赖途径在神经炎症中的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 29(1): 42-46.

[5] LI L R, MIAO X J, NI R Z, et al. Epithelial-specific ETS-1 (ESE1/ELF3) regulates apoptosis of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis via accelerating

- NF- κ B activation [J]. *Immunol Res*, 2015, 62 (2) : 198-212.
- [6] 张天涵,沈洪. 溃疡性结肠炎及其中医辨证分型与炎症活动性指标的相关性分析[J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(8) : 685-690.
- [7] 王文远,吴燕敏. 芍药汤加减治疗活动性溃疡性结肠炎 18 例[J]. *中国继续医学教育*, 2017, 9 (26) : 127-129.
- [8] 王宁. 加味芍药汤保留灌肠治疗 80 例湿热夹杂型慢性溃疡性结肠炎的临床疗效评测[D]. 石家庄:河北医科大学, 2017.
- [9] 王移飞,王凤仪,徐兰萍,等. 芍药汤经 HMGB_1 调节湿热型溃疡性结肠炎大鼠 MyD88 和 NF- κ B 的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12) : 86-91.
- [10] 徐敏,王凤仪,赵党生,等. 芍药汤对湿热内蕴型溃疡性结肠炎大鼠 TLR4, NF- κ B p65 和 IL-6 表达的调控作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(14) : 53-58.
- [11] 翁一洁,郑学宝. 湿热型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立与研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22 (10) : 2522-2525.
- [12] HAWKINS J V, EMMEL E L, FEUER J J, et al. Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats[J]. *Dig Dis Sci*, 1997, 42(9) : 1969-1980.
- [13] 朱代华,张兴明,郭丹. 二硝基苯磺酸诱导的鼠溃疡性结肠炎动物模型[J]. *重庆医科大学学报*, 2004 (4) : 486-487, 490.
- [14] 吴思梦,徐德魁,郑长青. 炎症性肠病患者肠黏膜白细胞分化抗原-14 的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(24) : 2526-2529.
- [15] 颜蓉,刘佛球,吴共发. CD14 在溃疡性结肠炎患者肠黏膜中的表达及与严重程度的关系[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2017, 38(5) : 579-581.
- [16] KIM S J. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14[J]. *BMB Rep*, 2017, 50(2) : 55-57.
- [17] TSUKAMOTO H, TAKEUCHI S, KUBOTA K, et al. Lipopolysaccharide (LPS) -binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK ϵ -IRF3 axis activation [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(26) : 10186-10201.
- [18] 高绍莹,罗军敏,秦欢. Toll 样受体信号介导细胞凋亡的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30 (4) : 440-443.
- [19] ZHANG X, ZHAO J, ZHU W, et al. Synergistic effect of subtoxic-dose cisplatin and TRAIL to mediate apoptosis by down-regulating decoy receptor 2 and up-regulating caspase-8, caspase-9 and bax expression on NCI-H460 and A549 cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(5) : 710-718.
- [20] 刘建平,吴鹤伶,郎晓猛,等. 泄浊解毒方对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-1 β 、IL-10 及结肠黏膜 CD14 的影响[J]. *河北中医药学报*, 2017, 32(2) : 1-4.
- [21] 高鸿亮,周禾,姚萍. 维生素 D₃ 对急性溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜 Toll 样受体 2 和髓样分化蛋白 2 及 CD14 表达的影响[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31 (7) : 649-652.
- [22] SAGGIORO F P, NEDER L, STÁVALE J N, et al. Fas, FasL, and cleaved Caspases 8 and 3 in glioblastomas: a tissue microarray-based study [J]. *Pathol Res Pract*, 2014, 210(5) : 267-273.
- [23] 王彦凤. LPS 诱导人结肠上皮细胞(NCM460)凋亡机制研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2017.
- [24] 潘锋,张涛,陈建永. 马齿苋多糖干预大鼠溃疡性结肠炎 Caspase-3, Caspase-8 表达的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(8) : 1639-1641.
- [25] 贾育新,毕殿勇,成映霞,等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎模型大鼠血清 IL-1 β 、IL-4 及 Caspase-8 基因蛋白表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27 (9) : 2084-2086.
- [26] 马克龙,韩志君,潘敏,等. 肉桂醛对白念珠菌定植下 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠治疗作用及对 dectin-1/TLRs/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(13) : 3211-3219.
- [27] 屈映,张书信,傅丽元,等. 荆芥、防风对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 AQP4 和 AQP8 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15) : 3719-3725.
- [28] 陈冠儒,张怡,郑育卿,等. 芪附理中灌肠方对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-8、IL-10 及肠黏膜 ICAM-1 表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(4) : 122-125.
- [29] 张艳晓. 附子理中汤灌肠对脾肾阳虚型 UC 模型大鼠结肠组织 ICAM-1 的影响[D]. 成都:成都中医药大学, 2016.
- [30] 刘涇科,薛晓东. 转化生长因子- β_1 与难愈性创面及病理性瘢痕形成关系研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29(9) : 833-834.
- [31] 肖亚南,张启芳. 转化生长因子 β 与炎症性肠病的相关性研究进展[J]. *广西医学*, 2017, 39(12) : 1908-1911.
- [32] 周天羽,张威,任晓颖. 基于“湿毒致病”清肠愈疡汤对溃疡性结肠炎大鼠炎症因子的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(10) : 137-140.
- [33] 彭月霜,韩可琪,阮昕,等. p53、TGF- β_1 及炎症细胞因子在新型酒精性肾损伤小鼠模型中的表达[J]. *现代免疫学*, 2019, 39(5) : 378-383.

[责任编辑 周冰冰]