

四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 Toll 样受体 4 及其负性调控因子 IRAK-M 表达的影响

王爱华¹, 何兰娟², 朱向东^{2*}

(1. 甘肃省中医院, 兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] 目的:观察 Toll 样受体 4(TLR4)及其负性调控因子白细胞介素-1 受体相关激酶 M(IRAK-M)在实验性溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠结肠黏膜中的表达,并探讨四神丸干预 UC 的作用机制。方法:将 90 只 Wistar 大鼠随机分成 6 组,即空白组,模型组,柳氮磺胺嘧啶组($0.36\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),四神丸低、中、高剂量组($2.5, 5, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组 15 只。以三硝基苯磺酸/乙醇溶液法制备 UC 大鼠模型,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠结肠组织病理学改变;采用放射免疫法测定血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT_3),血清游离甲状腺素(FT_4),免疫球蛋白(Ig)E,白细胞介素(IL)-2 的含量;采用黄嘌呤氧化法测定大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)活性;采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定大鼠血清丙二醛(MDA)的活性。采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR),免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 TLR4,IRAK-M 的 mRNA 及蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠肠黏膜损伤评分显著增高($P < 0.01$),大鼠血清 IgE,MDA 含量显著升高($P < 0.01$), $\text{FT}_3, \text{FT}_4, \text{IL-2, SOD}$ 表达水平显著下降($P < 0.01$),TLR4 mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.01$),IRAK-M mRNA 和蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠肠黏膜损伤评分均显著降低($P < 0.01$),IgE,MDA 含量明显下降($P < 0.05, P < 0.01$), $\text{FT}_3, \text{FT}_4, \text{IL-2, SOD}$ 水平明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),TLR4 mRNA 和蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),IRAK-M mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。结论:UC 的发病机制与 TLR4 及其负性调控因子 IRAK-M 的表达失衡有关,且四神丸可能通过抑制 TLR4 mRNA 和蛋白的表达,促进其负性调控因子 IRAK-M 的表达,起到有效治疗 UC 的作用。

[关键词] Toll 样受体 4; 白细胞介素 1 受体相关激酶 M; 溃疡性结肠炎; 四神丸; 作用机制

[中图分类号] R289;R285.5;R318.14;R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0070-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191439

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190401.1611.017.html>

[网络出版时间] 2019-04-04 17:20

Effect of Sishenwan on Toll-like Receptor 4 and IRAK-M Expression in Colonic Tissue of Rats with Ulcerative Colitis of Spleen-kidney Yang Deficiency Type

WANG Ai-hua¹, HE Lan-juan², ZHU Xiang-dong^{2*}

(1. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China;

2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the Toll-like receptor 4 (TLR4) and its negative regulating factor Interleukin-1 receptor-associated kinase-M (IRAK-M) in colonic mucosa of rats with experimental ulcerative colitis (UC), and to discuss the mechanism of the Chinese medicine Sishenwan. **Method:** The 90 Wistar rats were randomly divide into six groups, blank group, model group, sulfasalazine group ($0.36\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Sishenwan low, medium and high-dose group ($2.5, 5, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 15 cases in each group. A rat model of UC was prepared by using a solution of trinitrobenzenesulfonic acid / ethano. The histopathological changes of colon were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The contents of serum free triiodothyroid acid (FT_3), serum free

[收稿日期] 20181213(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360541)

[第一作者] 王爱华,副主任医师,从事风湿病相关研究,E-mail:1172663695@qq.com

[通信作者] *朱向东,博士,教授,从事中医治则治法相关研究,E-mail:zhuxiangdong33@163.com

thyroxine (FT₄), immunoglobulin (Ig) E and interleukin (IL) -2 were determined by radioimmunoassay. The activity of superoxide dismutase (SOD) in rat serum was determined by xanthine oxidation method. The activity of malondialdehyde (MDA) in serum of rats was determined by thiobarbituric acid (TBA) colorimetry. **Result:** Compared with blank group, intestinal mucosal injury score of rats in model group was significantly increased ($P < 0.01$), serum IgE and MDA contents were significantly increased ($P < 0.01$). The expression levels of FT₃, FT₄, IL-2 and SOD were significantly decreased ($P < 0.01$). The TLR4 mRNA and protein expression in model group increased significantly ($P < 0.01$). The expression of IRAK-M mRNA and protein decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, scores of each treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$), IgE and MDA contents were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), FT₃, FT₄, IL-2, and SOD contents were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of TLR4 mRNA and protein in each treatment group was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), IRAK-M mRNA and protein expression level increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The unbalanced expressions of TLR4 and its negative regulating factor IRAK-M are connected with the pathogenesis of UC. Sishenwan can cure UC and control the expression of TLR4 and promote the expression of IRAK-M.

[**Key words**] Toll-like receptor 4 (TLR4); interleukin-1 receptor-associated kinase-M (IRAK-M); ulcerative colitis; Sishenwan; mechanism

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性非特异性的炎性肠病,难根治且易复发,以腹痛、腹泻、便血等为主要临床表现^[1],近年在我国发病率呈上升趋势。该病通常被认为是结肠或直肠癌的癌前病变,其病因及发病机制不明确,目前研究与免疫因素关系密切^[2],其中 Toll 样受体(TLR)及其下游信号调控被发现可能在其发病机制与 UC 肠道炎症发生发展中担任重要角色^[3]。由于 TLR 是连接非特异性免疫和特异性免疫的高同源性跨膜蛋白,正常状态下其处于功能抑制状态,当有病原菌入侵,其可特异性识别脂多糖,机体免疫不耐受时可通过 TLR 激活细胞内的信号传导蛋白或激酶,引起该信号调控的相关炎症因子表达增强,诱导较强免疫应答^[4];当机体免疫耐受时避免了炎症反应过度,使炎症反应得到控制,这与 TLR 信号的负性调控因子的重要作用是分不开的^[5]。

目前西医治疗 UC 缺乏特异性药物,且存在复发率高、副作用大的缺点,而中医药治疗 UC 的临床疗效明确且副作用小,因此开发治疗 UC 的有效中药成为 UC 药物开发的重要方向^[6]。四神丸来源于《陈氏小儿痘疹方论》,具有温肾散寒,涩肠止泻之功效,是治疗脾肾虚寒所致泄泻重要方剂,研究发现其能够很好地消除结肠炎的各种症状^[7],并能有效的保护和修复患者的肠黏膜,但其黏膜免疫作用机制尚不明确^[8]。本实验通过研究 TLR 信号通路上的分子 TLR4 及白细胞介素(IL)-1 受体相关激酶-M (IRAK-M)在实验性 UC 大鼠结肠黏膜的表达,以及

四神丸治疗后该表达的变化,探讨四神丸治疗 UC 的发病机理,以期四神丸的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 90 只(SPF 级)由甘肃中医药大学科研实验动物中心提供,雌雄各半,体质量(180 ± 20)g,动物使用许可证号 SYXK(甘)2015-0005。动物饲养于甘肃中医药大学科研动物实验中心 SPF 级动物实验室。本实验符合甘肃中医药大学伦理委员会的各项实验原则,伦理审查编号 2012-074。

1.2 药物 四神丸(补骨脂 12 g,肉豆蔻,五味子,吴茱萸各 6 g,药物均由甘肃中医药大学药剂科提供),加生姜 24 g,大枣 10 枚煎煮去渣浓缩,制成质量浓度为 1 g·mL⁻¹的药液;番泻叶(榆中县隆兴药材饮片加工厂,批号 20141127),粉碎、浸泡、过滤去渣后浓缩为 1 g·mL⁻¹的水浸液;柳氮磺胺嘧啶肠溶片(上海信谊天平药业,批号 09140703),研磨并溶于蒸馏水制成质量浓度为 0.036 g·mL⁻¹的药液。氢化可的松注射液(荣生制药有限公司,批号 1404407-B11)。所有药品均于 4 °C 保存。

1.3 试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸/TNBS,trizol 试剂,cDNA 反转录试剂盒(美国 Sigma 公司,批号分别为 2508-19-2,74124,0000123564);实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(美国 Promega 公司,批号 0000144569);鼠抗 TLR4 一抗,鼠抗 IRAK-M 一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR85173-1,

GR87418-3);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 150401, 11728);血清游离三碘甲腺原氨酸(FT_3),血清游离甲状腺素(FT_4),IgE,IL-2 放射免疫试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号分别为 20150501, 20150502, 20150503, 20150504);超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150416, 20150417);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1120)。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, β -actin:上游引物 5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3',下游引物 5'-AAGGGTGTAAAACGCAGCTC-3',长度 41 bp;IRAK-M:上游引物 5'-TCCCACAGTCACAGGAAA CG-3',下游引物 5'-ACACAGAACATGCCGTAGCA-3',长度 75 bp;TLR4:上游引物 5'-TGGCATCATCTT CATTGTCC-3',下游引物 5'-CAGAGCATTGTCTCC CACT-3',长度 94 bp。

1.4 仪器 Gel Doc XR 型凝胶成像仪,Smart Spec 型核酸定量分析仪(美国伯乐公司);DW86L728J 型超低温冰箱(青岛海尔公司);ABI 7500 型 Real-time PCR 分析仪(美国 ABI 公司);DSX 100 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);Bio-Rad iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);DYCZ-40D/24D 型电泳仪及转膜仪,DYY-7C 型电泳仪电源,WD-5406 型摇床(北京六一生物科技有限公司)等。

2 方法

2.1 造模及分组 将 90 只大鼠随机分为 6 组,每组 15 只,分别为空白组、模型组、柳氮磺胺嘧啶组、四神丸低、中、高剂量组。除空白组外,其余各组大鼠以番泻叶 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃、氯化可的松 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射^[9],空白组以等体积的蒸馏水灌胃及生理盐水腹腔注射;21 d 后禁食不禁水 48 h,乙醚麻醉后,将聚丙烯管(直径 2 mm,长度 12 cm)经肛门缓慢插入达结肠部位(约 8 cm)后缓慢注入 TNBS/乙醇溶液($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),边打入空气边抽管后,快速捏紧肛门,提起大鼠尾部使其保持倒立,1 min 后人笼待其自然清醒。成模评价标准^[10-12],一般活动状态情况,大鼠皮毛黯淡无光泽、扎堆少动、精神萎靡、反应迟钝、腹部潮湿、大便质稀且/或伴有脓血便;结肠黏膜大体形态学改变,肉眼可见结肠黏膜有充血、水肿、局部溃疡等情况;结肠组织病理形态学改变,显微镜下可见结肠黏膜有

炎性细胞浸润、黏膜上层缺损、腺体结构改变等情况;各种参考指标(FT_3 , FT_4 , IgE, IL-2, SOD, MDA)的改变。

2.2 给药 给药标准参照人与大鼠体表系数折算法^[13],治疗共计 21 d。四神丸低、中、高剂量组按 $2.5, 5, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃干预治疗;柳氮磺胺嘧啶组按柳氮磺胺嘧啶混悬液 $0.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃干预治疗;空白组、模型组分别给予等体积的蒸馏水灌胃干预。

2.3 取材及标本制备 采用股动脉取血法取血,随后分离血清,置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。截取病变严重处的结肠组织(约肛门上 5~8 cm 处),磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净后纵行切开,肉眼观察结肠组织黏膜损伤情况并评分后,将一部分结肠放入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,一部分置于多聚甲醛中固定。

2.4 肉眼观察大鼠结肠组织黏膜损伤评分 评分标准参照 Wallace 等^[14]标准。结肠黏膜正常无损伤为 0 分;结肠黏膜局部充血但无溃疡为 1 分;有 1 处溃疡但不伴充血或肠壁增厚为 2 分;有 1 处溃疡且伴有炎症为 3 分;有 2 处及 2 处以上溃疡且伴有炎症为 4 分;>2 处溃疡且溃疡面超过 2 cm 为 5 分。

2.5 HE 染色观察大鼠结肠组织病理学改变 将大鼠结肠组织放入梯度乙醇中脱水处理;经苏木素染色后放入 1% 盐酸-乙醇溶液中进行分化;再经促蓝液返蓝,伊红染色,梯度乙醇中脱水,二甲苯液中透明后用中性树胶封片。待切片风干,在光镜下观察大鼠结肠病理学改变,并拍照分析。

2.6 检测 FT_3 , FT_4 , IgE, IL-2, SOD, MDA 的水平 采用放射免疫法测定 FT_3 及 FT_4 的含量,严格按照说明书操作,将液体加入试管混匀后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 定温 15 min, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清测各管沉淀的放射性计数(CPM),计算各指标的含量。采用放射免疫法测定 IL-2 的含量,严格按照说明书操作,将血清室温放置 15 min 后, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,弃上清,测各管沉淀 CPM 数,计算各 IL-2 的含量。采用放射免疫法测定 IgE 的含量,严格按照说明书操作,充分混匀, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 室温(20 ± 4) h 后洗涤,方法同上并测量 CPM。采用黄嘌呤氧化法测定大鼠血清 SOD 活性,严格按试剂盒说明书操作,将液体加入试管,漩涡混匀器混匀后放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅 40 min;取出各管加入显色剂 2 mL 并混匀,室温放置 10 min 后用可见分光光度计,双蒸水调零,于 550 nm 处,1 cm 光径比色。采用硫代巴比妥酸

(TBA) 比色法测定大鼠血清 MDA 的含量, 严格按照试剂盒说明书操作, 漩涡混匀器混匀, 试管口用保鲜膜扎紧并刺一小孔, 95 °C 水浴 40 min 后用流水冷却, 3 500 r · min⁻¹ 离心 10 min。于 532 nm 处, 1 cm 光径检测各管吸光度 A。

2.7 Real-time PCR 检测 TLR4, IRAK-M mRNA 的表达 采用经典 trizol 法, 用核酸定量分析仪测定总 RNA。逆转录为 cDNA, 严格按照试剂盒说明书进行操作。扩增反应体系为 20 μL, 其中 cDNA 2 μL, 上下游引物各 4 μL, Go Taq-qPCR Master Mix 10 μL, DEPC H₂O 补足至 20 μL。反应条件 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (40 循环), 95 °C 15 s, 60 °C 15 s。用参照基因 2^{-ΔΔC_t} 法计算 mRNA 的相对表达量。

2.8 免疫组化法检测 TLR4, IRAK-M 蛋白的表达 切片常规脱蜡至水, 抗原修复及灭活内源性过氧化物酶后, 阻断非特异性反应, 加入一抗 TLR4 (1:200), IRAK-M (1:500), 4 °C 过夜, PBS 冲洗; 加入山羊抗兔/小鼠 IgE, 37 °C 孵育 10 ~ 15 min, PBS 冲洗; 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37 °C 孵育 10 ~ 15 min, PBS 冲洗; DAB 显色剂显色、复染、脱水透明封片, 用 Imagepro Plus 软件分析其平均积分吸光度 IA。

2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 TLR4, IRAK-M 蛋白的表达 取结肠组织, 经 RIPA 裂解, 4 °C, 15 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 测蛋白浓度, 计算上样量。经 10% SDS-PAGE 电泳后, 电转至 0.22 mm 的 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。封闭后加入一抗 TLR4 (1:500), IRAK-M (1:2 000), β-actin (1:1 000), 37 °C 孵育 30 min, 4 °C 过夜; 用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min 后加入二抗 (1:5 000), 置于摇床 37 °C 孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次, 方法同上, 然后用 ECL 显色。用凝胶成像分析仪和 Imge Lab 软件进行曝光, 采用 Image J 软件进行分析。

2.10 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 UC 大鼠一般活动状态的影响 空白组反应灵敏, 皮毛顺滑光泽, 精神、饮食、大便正常; 模型组自主活动减少, 反应迟缓, 皮毛晦暗无光、精神萎靡不振、喜扎堆弓背嗜卧、形体消瘦、饮食活动量减少, 肛周污秽、便稀且伴有不同程度的黏液脓血便等

症状。各治疗组经治疗后症状均有不同程度的好转, 其中四神丸中、高剂量组及柳氮磺胺嘧啶组治疗效果较明显, 大鼠皮毛较光泽, 反应增强, 活动较灵敏, 粪便基本成颗粒状, 饮食、精神、体质量日趋正常。

3.2 对 UC 大鼠结肠大体形态学的影响 空白组大鼠结肠黏膜表面光滑, 无缺损、充血、水肿、溃疡、黏连等情况; 模型组大鼠结肠黏膜均由不同程度的充血、水肿, 局部伴有溃疡, 部分可见黏连。各治疗组经治疗后结肠黏膜损伤状况得到一定改善, 可见轻度充血、水肿, 大部分损伤恢复正常, 可见愈合瘢痕。与空白组比较, 模型组大鼠肠黏膜损伤评分显著增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组评分均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 四神丸对 UC 大鼠肠黏膜损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Sishenwan on intestinal mucosal injury in UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	结肠损伤评分/分
空白	-	0.3 ± 0.48
模型	-	2.9 ± 0.78 ¹⁾
柳氮磺胺嘧啶	0.36	1.3 ± 0.82 ³⁾
四神丸	2.5	1.7 ± 0.95 ³⁾
	5	1.0 ± 0.67 ³⁾
	10	1.5 ± 0.71 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 6 同)。

3.3 对 UC 大鼠结肠组织病理形态的影响 HE 染色结果显示, 空白组结肠各层组织结构完整清晰, 无炎性细胞浸润, 未见充血、水肿、糜烂、溃疡等情况; 模型组结肠黏膜上层缺损严重, 腺体结构模糊不清, 可见大量的炎性细胞浸润且部分伴有糜烂及溃疡; 各治疗组炎性细胞浸润明显减少, 黏膜上层逐渐恢复, 溃疡基本愈合, 部分可见肉芽组织增生及愈合瘢痕。见图 1。

3.4 对 UC 大鼠血清 IgE, IL-2, FT₃, FT₄, SOD, MDA 水平的影响 与空白组比较, 模型组大鼠血清 IgE, MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$), FT₃, FT₄, IL-2, SOD 水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠血清 IgE, MDA 水平明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), FT₃, FT₄, IL-2, SOD 水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

3.5 对 UC 大鼠结肠组织 TLR4 与 IRAK-M mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 TLR4 mRNA 表达水平显著上升 ($P < 0.01$),

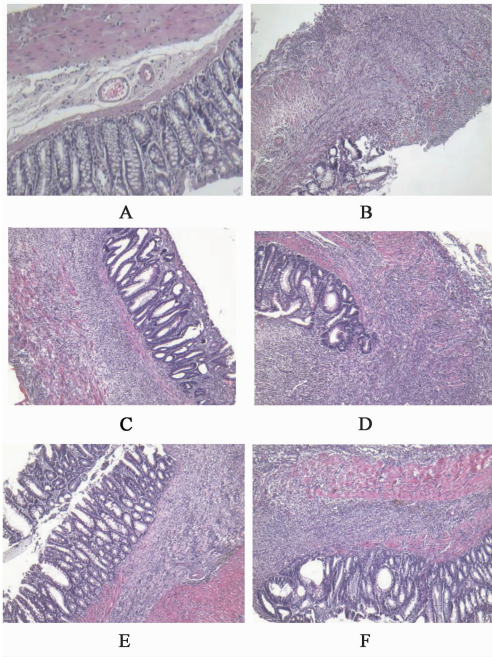


图 1 四神丸对 UC 大鼠结肠组织病理形态的影响(HE, ×40)
A. 空白组; B. 模型组; C. 柳氮磺胺嘧啶组; D. 四神丸低剂量组; E. 四神丸中剂量组; F. 四神丸高剂量组(图 2, 3 同)

图 1 四神丸对 UC 大鼠结肠组织病理形态的影响(HE, ×40)
Fig. 1 Effect of Sishenwan on pathological morphology of colon tissue in UC rats(HE, ×40)

表 2 四神丸对 UC 大鼠血清 FT₃, FT₄, IgE, IL-2, SOD, MDA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Sishenwan on expression of FT₃, FT₄, IgE, IL-2, SOD and MDA in serum of UC rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FT ₃ /mg·L ⁻¹	FT ₄ /mg·L ⁻¹	IgE/U·mL ⁻¹	IL-2/mg·L ⁻¹	SOD/mmol·L ⁻¹	MDA/mmol·L ⁻¹
空白	-	2.58 ± 0.68	10.75 ± 1.66	5.41 ± 0.79	38.86 ± 2.88	57.74 ± 4.52	6.31 ± 1.15
模型	-	1.04 ± 0.15 ¹⁾	6.09 ± 0.80 ¹⁾	10.50 ± 3.58 ¹⁾	30.71 ± 3.03 ¹⁾	44.31 ± 5.06 ¹⁾	9.55 ± 0.98 ¹⁾
柳氮磺胺嘧啶	0.36	1.53 ± 0.41 ²⁾	8.03 ± 2.12 ²⁾	7.39 ± 0.97 ²⁾	35.17 ± 3.06 ²⁾	54.79 ± 8.84 ²⁾	7.06 ± 2.00 ²⁾
四神丸	2.5	1.50 ± 0.55 ²⁾	7.68 ± 1.23 ³⁾	8.87 ± 1.78 ³⁾	34.67 ± 2.72 ²⁾	50.15 ± 3.48 ³⁾	7.62 ± 1.91 ³⁾
	5	1.52 ± 0.48 ²⁾	8.61 ± 1.67 ²⁾	7.86 ± 2.09 ²⁾	36.15 ± 5.70 ³⁾	50.35 ± 5.85 ³⁾	7.14 ± 1.72 ²⁾
	10	1.56 ± 0.55 ²⁾	8.10 ± 1.82 ²⁾	7.36 ± 1.75 ²⁾	36.13 ± 6.67 ³⁾	50.47 ± 4.10 ³⁾	6.85 ± 2.26 ³⁾

表 3 四神丸对 UC 大鼠结肠组织 TLR4 与 IRAK-M mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Sishenwan on TLR4 and IRAK-M mRNA expression in colon tissue of UC rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4	IRAK-M
模型	-	1.76 ± 0.16 ¹⁾	0.52 ± 0.26 ¹⁾
柳氮磺胺嘧啶	0.36	1.51 ± 0.26 ²⁾	0.72 ± 0.10 ²⁾
四神丸	2.5	1.53 ± 0.29 ²⁾	0.68 ± 0.16 ³⁾
	5	1.41 ± 0.21 ³⁾	0.71 ± 0.16 ²⁾
	10	1.43 ± 0.20 ³⁾	0.72 ± 0.90 ²⁾

注:空白组 TLR4, IRAK-M mRNA 相对表达设为 1。

IRAK-M mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 TLR4 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),IRAK-M mRNA 表达水平明显上升($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.6 对 UC 大鼠结肠组织 TLR4 与 IRAK-M 蛋白定位表达的影响 TLR4 在空白组中表达为阴性,在模型组中的黏膜上层和固有层中为高表达,在各治疗组为较低或中等表达。IRAK-M 在空白组中的黏膜层、肌层中为高表达,在模型组中呈现低表达,在各治疗组中主要呈现中等表达。与空白组比较,模型组 TLR4 表达明显升高($P < 0.05$),IRAK-M 表达显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 TLR4 蛋白表达明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),IRAK-M 表达水平显著上升($P < 0.01$)。见图 2,表 4。

3.7 对 UC 大鼠结肠组织 TLR4 与 IRAK-M 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织 TLR4 蛋白表达水平显著上升($P < 0.01$),IRAK-M 蛋白表达水平明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠结肠组织 TLR4 蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$),IRAK-M 蛋白表达水平显著上升($P < 0.01$)。见图 3,表 5。

4 讨论

UC 属于中医“久泻”“痢疾”范畴,目前有研究证明该病的发生与机体肠道黏膜免疫功能关系密切^[15]。近年来 UC 的发病率持续上升,但是临床却缺乏特异性治疗药物。中医认为,UC 的发病与脾肾密切相关,而四神丸作为温补脾肾、固涩止泻的代表名方,对 UC 有良好的治疗作用。方中补骨脂为治肾虚泄泻之要药,尤善补命门之火,重用为君;肉豆蔻辛苦性温,主温中涩肠、行气止泻,是为臣药;佐以吴茱萸温中理气止痛,五味子收敛止泻;生姜温胃散寒,大枣健脾益胃,同为使药。共成温肾暖脾,涩肠止泻之功。

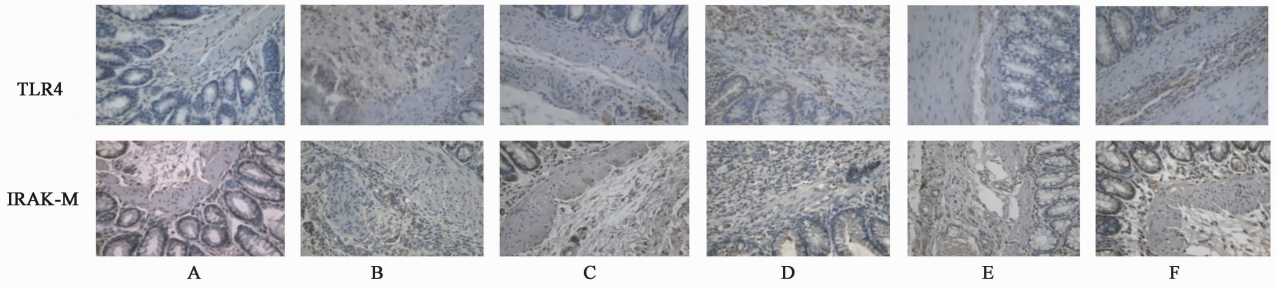


图 2 四神丸对 UC 大鼠结肠组织 TLR4,IRAK-M 蛋白表达的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 2 Effect of Sishenwan on expression of TLR4 and IRAK-M protein in colon of UC rats(IHC, ×100)

表 4 四神丸对 UC 大鼠结肠组织 TLR4 与 IRAK-M 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Sishenwan on TLR4 and IRAK-M protein expression in colon tissue of UC rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4	IRAK-M
空白	-	0.332 ± 0.158	0.429 ± 0.009
模型	-	0.348 ± 0.017 ¹⁾	0.364 ± 0.013 ¹⁾
柳氮磺胺嘧啶	0.36	0.327 ± 0.165 ²⁾	0.423 ± 0.014 ²⁾
四神丸	2.5	0.334 ± 0.123 ³⁾	0.384 ± 0.103 ²⁾
	5	0.311 ± 0.008 ²⁾	0.397 ± 0.014 ²⁾
	10	0.300 ± 0.009 ²⁾	0.391 ± 0.013 ²⁾

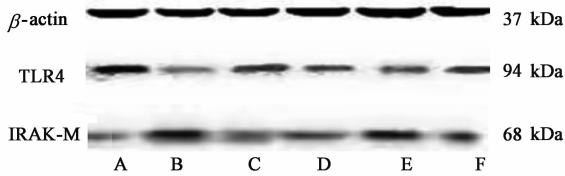


图 3 大鼠结肠组织中 TLR4,IRAK-M 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of TLR4, IRAK-M in colon of UC rats

表 5 四神丸对 UC 大鼠结肠组织中 TLR4,IRAK-M 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Sishenwan on relative expression of TLR4 and IRAK-M protein in colon of UC rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4/ β -actin	IRAK-M/ β -actin
空白	-	0.459 ± 0.079	0.589 ± 0.020
模型	-	0.920 ± 0.032 ¹⁾	0.425 ± 0.056 ¹⁾
柳氮磺胺嘧啶	0.36	0.808 ± 0.077 ²⁾	0.482 ± 0.031 ²⁾
四神丸	2.5	0.855 ± 0.031 ²⁾	0.475 ± 0.036 ³⁾
	5	0.752 ± 0.049 ²⁾	0.553 ± 0.035 ²⁾
	10	0.815 ± 0.052 ²⁾	0.499 ± 0.046 ²⁾

TLR 是天然免疫的第一道屏障,具有识别侵入体内的微生物进而激活免疫细胞应答的作用。TLR4 是较早发现的 TLRs 家族成员之一,能够直接

介导机体与病原体之间的反应。目前研究发现。TLR4 作为 LPS 的主要受体,可以特异性的识别 LPS,并且 TLR4 是机体与 LPS 反应中的主要信号转导分子^[16]。LPS 进入机体后与血浆中游离的 LBP 结合成复合物,复合物与细胞膜上的跨膜受体 TLR4 结合,触发细胞内的信号传递,合成并释放一系列的细胞因子和炎性介质抵抗感染,诱发机体的特异性免疫反应,使机体发挥更强的保护作用^[17]。武志娟等^[18]研究发现,在 D-IBS 中 TLR4 的表达明显增高,说明 TLR4 与免疫应答和肠道稳态密切相关。

IRAK-M 作为 TLR 信号通路中重要的负性调控因子之一,其机制可能是通过抑制 IRAK-4 对 IRAK-1 的磷酸化,稳定 TLR/髓样分化因子 88 (MyD88)/IRAK-4/IRAK-1 复合物,阻止下游 IRAK-TRAF6 免疫复合体形成,从而对 TLR 通路起到负性调节的作用,减弱 TLR 信号转导,抑制过度的炎症反应^[19]。多项研究都已表明,IRAK-M 在固有免疫反应的发生过程中起重要作用^[20]。IRAK-M 的调节作用使固有免疫发挥作用的同时限制了过强的炎症反应对组织器官所带来的损伤,从而对机体产生了保护作用。DENG 等^[21]研究发现,缺乏 IRAK-M 基因鼠的炎性细胞大量增加,炎症反应明显增强;张文兰等^[22]研究也发现,SLE 免疫紊乱的炎症状态下 IRAK-M 的表达是明显降低的,这些充分说明 IRAK-M 与炎症反应的密切相关性。

本研究结果显示,四神丸组大鼠较模型组大鼠的一般状况明显好转,结肠肉眼观察充血、水肿及溃疡明显减轻,说明四神丸对 UC 大鼠结肠黏膜的修复作用明显。模型组的 TLR-4 mRNA 和蛋白表达升高,经治疗后明显下降,而模型组 IRAK-M 的 mRNA 和蛋白明显下调,经治疗后又显著增高,说明四神丸可以下调 TLR4 和上调负性调控因子 IRAK-M,其治疗 UC 的机制可能是通过抑制 TLR 信号通路的过度

活化,从而防止过度的炎症反应有关。

[参考文献]

- [1] 王移飞,王凤仪,徐兰萍,等.芍药汤经 HMGB1 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.
- [2] Iskandar H N, Dhery T, Farraye F A. Ulcerative colitis; update on medical management [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2015, 17(11):44-53.
- [3] 高鸿亮,王磊,麦提图尔荪·阿不杜拉,等.维生素 D3 对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜上皮细胞 Toll 样受体表达的调控作用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(12):1181-1183.
- [4] 于高水,杨玉荣,梁宏德. Toll 样受体研究进展[J].细胞生物学杂志,2009,31(3):339-343.
- [5] 邢陈,黎燕,沈倍奋,等.调节性 B 细胞的研究进展[J].国际药学研究杂志,2015,42(3):326-330,354.
- [6] 吴东升,曹晖,张彧,等.芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜免疫屏障的干预作用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(9):6-11.
- [7] 王旭丹,葛东宇,李根茂,等.四神丸和葛根芩连片对 DSS 诱导的小鼠实验性结肠炎的作用比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(15):142-146.
- [8] 刘端勇,徐荣,黄敏芳,等.四神丸调节结肠炎大鼠 PP 结 T 细胞亚群及 Treg/Th17 间平衡的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(3):107-111.
- [9] 朱丹,张怡,王毅,等.大鼠溃疡性结肠炎(脾肾阳虚模型)模型实验研究[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(5):120-123.
- [10] 王焱霏,朱莹,王璇.溃疡性结肠炎(脾肾阳虚模证)大鼠模型的实验研究[J].中国中医急症,2015,24(8):1332-1334,1391.
- [11] 梁茂新,高天舒.《中药新药临床研究指导原则》脏腑诸证考察与分析[J].中国中医基础医学杂志,2008,14(5):330-331,342.
- [12] 陈小野.脾虚证动物模型的造模思路[J].中医杂志,1995,36(4):239-241.
- [13] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2006:18.
- [14] Wallace J L, Keenan C M. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis [J]. *AM J Physiol*, 1990, 258 (4Pt1): G257-G534.
- [15] 顾培青,沈洪,朱磊,等.清肠化湿方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 PPAR- γ , NF- κ B 及 MUC2, TFF3 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(3):79-85.
- [16] 杨一新,李桂源. LPS 所介导的信号转导通路研究进展[J].中南大学学报:医学版,2006,31(1):141-145.
- [17] 赵保胜,霍海如,姜廷良. Toll 样受体 4 的研究及现状[J].中国临床药理学与治疗学,2007,12(1):19-22.
- [18] 武志娟,张志敏,张大鹏,等.附子理中汤对腹泻型肠易激大鼠模型结肠组织中 TLR4 mRNA 表达水平的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(15):218-221.
- [19] 郑佳佳,万敬员. IRAK-M 在 TLRs 信号转导中负性调节作用的研究进展[J].生命科学,2009,21(3):430-433.
- [20] 余烁.白细胞介素 1 受体相关激酶(IRAK)家族在基于 Toll 样受体 4 信号通路介导的急性前葡萄膜炎发病中所起作用及红芪多糖干预机制的研究[D].北京:首都医科大学,2017.
- [21] DENG J C, CHENG G H, Newstead M W, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116 (9): 2532-2542.
- [22] 张文兰,胡同平,王慧,等.系统性红斑狼疮患者单核细胞中 TLR-4、IRAK-M 的表达及意义[J].免疫学杂志,2013,29(6):510-513.

[责任编辑 孙丛丛]