

氧化苦参碱调控 RhoA/ROCK 信号通路介导溃疡性结肠炎 E-cadherin 及 TGF- β 的影响

王一帆, 范恒*

(华中科技大学 同济医学院 附属协和医院, 武汉 430022)

[摘要] **目的:**通过检测小鼠结肠组织中 Rho 激酶 (ROCK), E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 及转化生长因子- β (TGF- β) 相关指标变化, 探讨氧化苦参碱通过 RhoA/ROCK 信号通路介导上皮-间充质转化, 防治溃疡性结肠炎 (UC) 及其相关癌变的机制。**方法:**48 只 SPF 级 Balb/c 雄性小鼠随机分为正常组, 模型组, 氧化苦参碱低、中、高剂量组 (25, 50, 100 mg·kg⁻¹), Rho 激酶抑制剂 (Y-27632) 组 (10 mg·kg⁻¹)。采用 3% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 自由饮用 1 周法制备 UC 模型, 腹腔注射的方式给药, 正常组和模型组腹腔注射等体积的磷酸盐缓冲液 (PBS)。自造模起, 每天记录小鼠体质量、粪便的性状、隐血及肉眼血便情况, 连续给药 1 周, 第 8 天处死全部小鼠, 评估 UC 小鼠疾病活动指数 (DAI); 对小鼠结肠进行病理学评分; 采用透射电镜观察各组小鼠结肠组织超微结构变化; 酶联免疫吸附法测定法 (ELISA) 检测结肠组织 TGF- β 含量; 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 及实时荧光定量 PCR 法 (Real-time PCR) 检测小鼠结肠组织 Rho 激酶-1 (ROCK-1), Rho 激酶-2 (ROCK-2), E-cadherin, TGF- β 蛋白及 mRNA 的表达。**结果:**与正常组比较, 模型组光镜下见黏膜及黏膜下层大量炎性细胞浸润、腺体排列紊乱、伴有不同程度肠黏膜缺损、甚有溃疡形成, 电镜下见肠上皮细胞表面微绒毛稀疏, 细胞连接间隙增宽, 杯状细胞减少, 细胞器肿胀, DAI 评分显著升高 ($P < 0.01$), 结肠组织 ROCK-1, ROCK-2 蛋白和 mRNA 含量均显著升高 ($P < 0.01$), 结肠长度显著降低 ($P < 0.01$), 结肠组织 E-cadherin, TGF- β 蛋白和 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组小鼠光镜及电镜下病理表现均有不同程度的改善, DAI 评分显著降低 ($P < 0.01$), 结肠长度显著增加 ($P < 0.01$), 结肠组织 ROCK-1, ROCK-2 蛋白和 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$), E-cadherin, TGF- β 蛋白和 mRNA 表达显著上升 ($P < 0.01$); 与氧化苦参碱中剂量组比较, 氧化苦参碱低、高剂量组 ROCK-1, ROCK-2 蛋白和 mRNA 含量均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), TGF- β 和 E-cadherin 蛋白和 mRNA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。**结论:**氧化苦参碱可通过下调 Rho 激酶表达, 上调 E-cadherin 和 TGF- β 表达, 诱导肠上皮细胞凋亡, 介导上皮-间充质转化, 从而达到缓解溃疡性结肠炎的功效。

[关键词] 氧化苦参碱; 溃疡性结肠炎; RhoA/Rho 激酶 (ROCK) 信号通路; E-钙黏蛋白; 转化生长因子- β

[中图分类号] R285; R285.5; R318.14; R322.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0073-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190638

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181206.1413.005.html>

[网络出版时间] 2018-12-07 14:30

Effect of Oxymatrine Mediated by RhoA/ROCK Signaling Pathway on Expression of E-cadherin and TGF- β in Ulcerative Colitis

WANG Yi-fan, FAN Heng*

(Wuhan Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Oxymatrine on epithelial-mesenchymal transition mediated by RhoA/Rho-associated kinase (ROCK) signaling pathway to prevent and treat ulcerative colitis (UC)

[收稿日期] 20180906(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774093)

[第一作者] 王一帆, 在读硕士, 从事消化系统疾病临床诊治与基础研究, E-mail: 1169532367@qq.com

[通信作者] * 范恒, 博士, 主任医师, 从事消化系统疾病及疑难杂症临床诊治与基础研究, E-mail: fanheng009@aliyun.com

and its related canceration by detecting the changes of ROCK, E-cadherin and transforming growth factor- β (TGF- β) in colon tissues of mice. **Method:** Totally 48 male Balb/c mice were randomly divided into normal control group, model group, low, medium and high-dose Oxymatrine groups (25, 50, 100 mg·kg⁻¹) and Y-27632 group (10 mg·kg⁻¹), with 8 mice in each group. Mice in control group received distilled water, while all the other mice were treated with 3% dextra sulfate sodium for 7 days to induce the ulcerative colitis model. Since the first day of modeling, Y-27632 (10 mg·kg⁻¹) and different doses of Oxymatrine (25, 50, 100 mg·kg⁻¹) were intraperitoneally injected for 7 days, and equal volume of PBS was intraperitoneally injected in normal group and model group. Body weight loss, stool consistency and fecal blood loss were observed on a daily basis. On the 8th day, mice were put to death, colon was collected and its length was measured; the scores of disease activity index (DAI) were evaluated; part of the colons were fixed and stained with hematoxylin and eosin (HE) for a histopathological analysis; the ultrastructural changes of mucosa tissue in ulcerative colitis were observed by transmission electron microscope. The expression levels of TGF- β in tissue mucosa were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of Rho-associated kinase-1, Rho-associated kinase-2, E-cadherin and TGF- β in colon were measured by Western blot and Real-time PCR. **Result:** Compared with normal group, model group showed the infiltration of a large number of inflammatory cells in mucosa and submucosa, disordered gland arrangement, varying degrees of intestinal mucosal defect and even ulcer formation. Under electron microscopy, microvilli were sparse on the surface of intestinal epithelial cells, the gap between cell junctions was widened, goblet cells were reduced and organelles were swollen. The disease activity index, and the expression levels of ROCK-1 and ROCK-2 proteins in the colonic mucosa of model group were increased ($P < 0.01$), while the colon length and the protein and mRNA contents of E-cadherin, TGF- β were decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, there were different degrees of alleviations in pathological manifestations under the light and electron microscopy in each treatment group. DAI score and colon length reduction were significantly decreased in each treatment group ($P < 0.01$). The proteins and mRNA expression levels of colonic mucosa ROCK-1 and ROCK-2 of the treatment group were decreased ($P < 0.01$), while the protein and mRNA expression levels of E-cadherin and TGF- β were increased ($P < 0.01$), which was statistically significant compared with model group. Compared with middle-dose Oxymatrine group, the ROCK-1 and ROCK-2 protein and mRNA levels were significantly increased in low-dose and high-dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the TGF- β and E-cadherin protein and mRNA levels were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Oxymatrine may alleviate ulcerative colitis by down-regulating the expression of Rho kinase, up-regulating the expressions of E-cadherin and TGF- β , inducing the apoptosis of intestinal epithelial cells, and mediating epithelial-mesenchymal transition.

[**Key words**] oxymatrine; ulcerative colitis; RhoA/Rho-associated kinase (ROCK) signaling pathway; E-cadherin; transforming growth factor- β

溃疡性结肠炎(UC)是慢性肠道炎症性肠病的一种,以反复发作的腹痛、腹泻、黏液脓血便以及伴随不同程度的全身症状为主要临床表现。病变多发生在黏膜及黏膜下层,伴有慢性复发和长期功能障碍的特点^[1]。肠炎相关性结肠癌作为 UC 患者的主要致死因素之一,虽然具体发病机制尚不明确,但有研究表明,上皮细胞-间充质转化(EMT)在此项进程中起着至关重要的作用^[2]。EMT 可使上皮细胞失去细胞极性,失去上皮表型,如与基底膜连接,从而获得高转移表型,如迁移和侵袭,抗凋亡和降解细胞外基质的能力等,以及 RhoA/Rho 激酶(ROCK)

信号通路调控 E-钙黏蛋白(E-cadherin)及转化生长因子- β (TGF- β)表达在上述过程中的表达具有重要意义^[3-4]。虽然该病发病机制尚不明确,但有相关研究报道认为多与基因易感性、免疫功能紊乱以及饮食环境等因素有关^[5-7]。目前治疗多以氨基水杨酸类、类固醇类以及免疫抑制剂等,然而因其费用高、副作用大,治疗效果也不甚满意。因此探究 UC 新的发病机制以及开发新的药物治疗 UC 成为当今社会研究的一大难点和热点^[8]。

复方苦参汤对于 UC 有良好的治疗效果,但是其作用具体机制尚不明确^[9]。氧化苦参碱作为

复方苦参汤主要活性成分之一, 目前已经有研究证实具有抗炎、抗氧化、促凋亡、抗肿瘤、抗纤维化、抗氧化、抗心律失常、抗病毒等活性^[10]。本研究旨在从氧化苦参碱着手, 探究氧化苦参碱通过介导 RhoA/ROCK 信号通路对葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的 UC 小鼠的治疗作用, 及其对 E-cadherin 和 TGF- β 表达的影响, 从而为预防和治疗溃疡性结肠炎及其癌变过程提供新的思路和治疗靶点。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Balb/c 雄鼠 48 只, 体质量 18 ~ 22 g, 购自华中科技大学同济医学院附属协和医院动物实验中心, 动物合格证号 SCXK (鄂) 2016-0009, 动物饲养在华中科技大学同济医学院动物中心, 许可证号 SYXK (鄂) 2016-0057, 普通饲料喂养, 自由饮水。本研究所有涉及动物及其护理的程序都严格遵守华中科技大学动物研究所委员会的指导方针, 并得到华中科技大学动物保护和使用委员会机构 (IACUC) 的批准。

1.2 药品及试剂 氧化苦参碱 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司提供, 批号 A111285); DSS (美国 MPBiomedicals 公司, 批号 Q7418); Rho 激酶抑制剂 (Y-27632, 英国 Tocris Bioscience 公司, 批号 1254); TGF- β 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉科鹿生物科技有限责任公司, 批号 ELK1186); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, RIPA 总蛋白裂解液, ECL 化学发光检测试剂盒, BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (美国 ASPEN 公司, 批号分别为 AS1012, AS1004, AS1059, AS108); 兔抗小鼠 TGF- β 抗体, 兔抗小鼠 Rho 激酶-1 (ROCK-1) 抗体, 兔抗小鼠 Rho 激酶-2 (ROCK-2) 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab92486, ab45171, ab71598); 兔抗小鼠 E-cadherin 抗体 (美国 CST 公司, 批号 3195); β -肌动蛋白 (β -actin, 北京天德悦生物科技有限责任公司, 批号 TDY051); 二抗山羊抗兔-HRP (武汉阿斯本生物技术有限公司, 批号 AS1107); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 武汉阿斯本生物技术有限公司, 批号 AS1069); 苏木素-伊红 (HE) 染色液 (武汉阿斯本生物技术有限公司, 批号 AS1055A); RNA 提取试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 15596-026); 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒 (日本 Takara 公司, 批号 RR047A); 电镜标本固定液 (武汉阿斯本生物技术有限公司, 批号 AS1063)。

1.3 仪器 IX51 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); DYY-6C 型电泳仪, DYCZ-400D 型转膜仪 (北

京市六一仪器厂); Power Wave HT340 型酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Tek 公司); H-600 型透射电镜 (日本日立公司); TGL-16 型冷冻离心机 (湖南湘仪仪器公司); StepOne™ Real-Time PCR System 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Life technologies 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 全部小鼠适应性喂养 1 周, 正常组同步饲养, 其余实验小鼠采用 3% DSS 自由饮用 1 周法制备 UC 模型, 每组 8 只, 自造模的第一天起, 正常组和 UC 模型组给予等剂量的 PBS 腹腔注射, 治疗组按照氧化苦参碱的低、中、高剂量 (25, 50, 100 mg·kg⁻¹)^[10] 和 Y-27632 (10 mg·kg⁻¹)^[11] 分别给予腹腔注射。连续给药 1 周, 当小鼠出现腹泻、黏液血便以及体质量减轻等症状时, 说明造模成功^[8]。第 8 天处死全部小鼠, 取小鼠结肠组织分别置于甲醛、电镜固定液, -80 °C 冰箱保存备用。

2.2 疾病活动指数 (DAI) 评估 每天记录小鼠体质量变化, 观察并记录小鼠粪便性状改变及便血情况, 根据公式“疾病活动指数 = (体质量评分 + 粪便性状评分 + 隐血评分) / 3”对各组大鼠进行 DAI 评分^[12]。见表 1。

表 1 疾病活动指数 (DAI) 评分标准

Table 1 Score standard of disease activity index (DAI)

评分/分	体质量下降率/%	大便秘状	大便隐血
0	0	无改变	无
1	1 ~ 5	松软	+
2	6 ~ 10	松软	+
3	11 ~ 15	便溏	肉眼血便
4	>15	便溏	肉眼血便

2.3 结肠长度变化 造模后第 8 天, 颈椎脱臼处死各组小鼠, 取肛门至回盲部段结肠, 测量并记录其自然长度。

2.4 HE 染色观察结肠组织病理学变化 实验第 8 天, 取结肠病变部位, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 组织切片, 片厚为 4 μ m, 后进行 HE 染色, 在光学显微镜下观察结肠组织病理学改变情况。

2.5 透射电镜观察小鼠肠黏膜组织超微结构变化 将预处理的结肠组织固定在 1% 戊二醛和 4% 多聚甲醛的 PBS 中, 后固定在 1% 四氧化锇中, 分级醇脱水, 丙酮及包埋剂渗透后埋入环氧树脂中。用醋酸铀酰和柠檬酸铅对 60 ~ 80 nm 的超薄片进行染色, 然后在 HT7700 电子显微镜下进行检测。

2.6 ELISA 检测小鼠结肠组织 TGF-β 含量 取结肠黏膜组织,加适量抽提缓冲液,4 ℃ 制备匀浆,4 ℃, 15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液测定 TGF-β,具体步骤均按试剂盒说明操作,将样品移液到孔中并在 37 ℃ 下孵育 90 min,除去各孔液体,立即向各孔中加入生物素化检测工作液 100 μL,在 37 ℃ 下孵育 1 h 后,将各孔洗涤三次并除去液体。向每个孔中加入 HRP 缀合物工作溶液 100 μL,并在 37 ℃ 下孵育 30 min。各孔中加入 90 μL 底物溶液,并在室温避光温育约 15 min,450 nm 波长处读取吸光度,重复实验 2 次。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin, TGF-β 蛋白的表达 结肠组织蛋白提取变性后上样,每孔上样总蛋白量为 40 μg,经过电泳、转膜,先后加入稀释好的一抗 ROCK-1 (1 : 2 000), ROCK-2 (1 : 2 000), TGF-β (1 : 500), E-cadherin (1 : 1 000), β-actin (1 : 10 000) 于 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,再加二抗 (1 : 10 000), 室温孵育 1 h, 根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影。以灰度值比值表示该蛋白相对表达水平。

2.8 Real-time PCR 检测小鼠结肠组织 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin, TGF-β mRNA 的表达 取小鼠结肠组织约 100 mg,按试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录后用 Real-time PCR 仪进行扩增,第一步,预变性,1 个循环,95 ℃ 1 min;第二步,PCR 反应,40 个循环,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,转录水平通过公式 2^{-ΔΔC_t} 计算。引物均由武汉金开瑞生物工程有限公司设计合成,其序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
ROCK1	上游 5'-GGACGAGAGTGTGACTGGTGG-3'	219
	下游 5'-ACCATTTCTGCCCAATCTCAC-3'	
ROCK2	上游 5'-CAGCAACTTTGACGACATTGAG-3'	274
	下游 5'-AGATTTGCACTTCTGTTCCAGC-3'	
E-cadherin	上游 5'-GACCGGAAGTGACTCGAAATG-3'	175
	下游 5'-CCCTCGTAATCGAACCAAC-3'	
TGF-β	上游 5'-AGAGCCCTGGATACCAACTATTG-3'	286
	下游 5'-TGCGACCCACGTAAGTAGACG-3'	
β-actin	上游 5'-CTGAGAGGAAATCTGCGT-3'	208
	下游 5'-CCACAGGATTCCATACCCAAGA-3'	

2.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件,数据

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 氧化苦参碱对 UC 小鼠 DAI 评分的影响 正常组小鼠活动自如,毛发有光泽,饮食如常,精神状态良好,与正常组比较,其余小鼠在造模第 3 天开始出现便溏,甚则可见肉眼血便,毛发无光泽,饮食活动均较前明显减少,随着造模时间的延长症状逐渐加重。与正常组比较,模型组 DAI 评分显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,氧化苦参碱各剂量组以及 Y-27632 组 DAI 评分显著降低 ($P < 0.01$);与氧化苦参碱中剂量组比较,氧化苦参碱低剂量组及高剂量组 DAI 评分高于中剂量组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 氧化苦参碱对 DSS 致小鼠肠炎 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of Oxymatrine on DAI score in mice with DSS-induced colitis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	DAI/分
正常	-	0
模型	-	3.94 ± 0.18 ¹⁾
氧化苦参碱	25	3.29 ± 0.45 ^{2,3)}
	50	2.25 ± 0.58 ²⁾
	100	3.00 ± 0.53 ^{2,3)}
Y-27632	10	3.19 ± 0.37 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与氧化苦参碱中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4~7 同)。

3.2 对 UC 小鼠结肠长度的影响 与正常组比较,模型组小鼠肠长度显著缩短 ($P < 0.01$);与模型组比较,氧化苦参碱低、中、高剂量组及 Y-27632 组,小鼠结肠长度显著增长 ($P < 0.01$);与氧化苦参碱中剂量组比较,氧化苦参碱低剂量组结肠长度显著低于中剂量组 ($P < 0.01$),氧化苦参碱高剂量组小鼠结肠长度与中剂量组无统计学差异。见表 4。

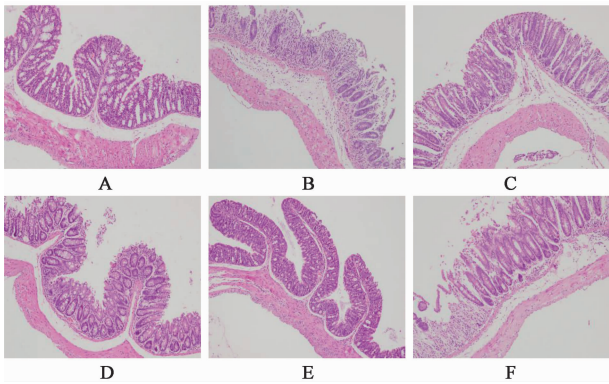
3.3 对小鼠结肠黏膜组织病理学的影响 正常组小鼠结肠黏膜结构完好,腺体排列整齐,未见炎性细胞浸润和黏膜下层充血水肿。与正常组比较,模型组小鼠结肠黏膜可见大量炎性细胞浸润,腺体排列紊乱,杯状细胞减少;与模型组比较,氧化苦参碱低、中、高剂量组及 Y-27632 组小鼠结肠黏膜病变较 UC 模型组损伤有不同程度的改善。见图 1。

3.4 对小鼠结肠黏膜组织超微结构变化 正常组结肠黏膜腺体排列整齐,细胞之间连接紧密,细胞器

表 4 氧化苦参碱对 UC 小鼠结肠长度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Oxymatrine on colon length in ulcerative colitis of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	结肠长度/cm
正常	-	10.25 ± 1.04
模型	-	6.19 ± 0.46 ¹⁾
氧化苦参碱	25	7.25 ± 0.89 ^{2,4)}
	50	8.69 ± 1.07 ²⁾
	100	8.00 ± 0.85 ²⁾
Y-27632	10	7.38 ± 0.64 ²⁾



A. 正常组; B. 模型组; C ~ E. 氧化苦参碱低、中、高剂量组; F. Y-27632 组 (图 2, 3 同)

图 1 氧化苦参碱对 DSS 致小鼠肠炎肠组织病理评分的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effects of Oxymatrine on colon pathology in mice with DSS induced colitis (HE, ×100)

未见明显的改变;与正常组比较,模型组肠上皮细胞表面微绒毛稀疏,形态不规则,细胞连接间隙较正常组明显增宽,杯状细胞明显减少,细胞器肿胀,胞浆内可见空泡。与模型组比较,各治疗组均有不同程度的改善。见图 2。

3.5 对 UC 小鼠结肠 TGF- β 的影响 与正常组比较,模型组小鼠结肠 TGF- β 的含量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 TGF- β 的含量均明显升高 ($P < 0.01$);与氧化苦参碱中剂量组比较,氧化苦参碱低剂量组、高剂量组 TGF- β 的含量明显降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

3.6 氧化苦参碱对结肠组织 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin, TGF- β mRNA 水平的影响 与正常组比较,模型组结肠组织 ROCK-1, ROCK-2 mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.01$), E-cadherin, TGF- β mRNA 水平含量均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,氧化苦参碱各剂量组和 Y-27632 组 ROCK-1, ROCK-2 mRNA 水平含量均显著降低 ($P < 0.01$),

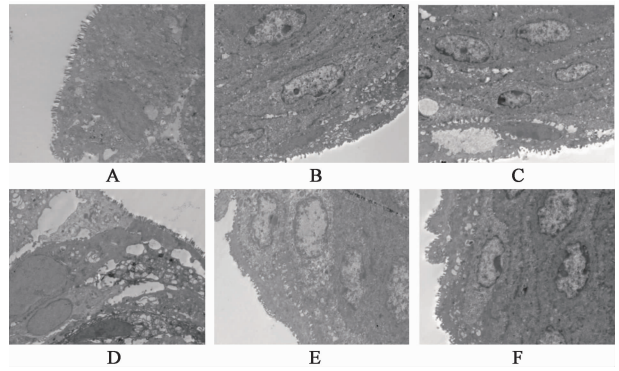


图 2 氧化苦参碱对 UC 小鼠结肠超微结构的影响 (透射电镜, ×2 000)

Fig. 2 Effect of Oxymatrine on colonic ultrastructure in UC mice (TEM, ×2 000)

表 5 氧化苦参碱对结肠组织 TGF- β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of Oxymatrine on the level of TGF- β in colon tissue ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TGF- β / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	21.382 ± 1.066
模型	-	16.631 ± 1.284 ¹⁾
氧化苦参碱	25	18.485 ± 1.334 ^{2,4)}
	50	21.914 ± 1.520 ²⁾
	100	19.894 ± 1.663 ^{2,4)}
Y-27632	10	18.653 ± 1.666 ²⁾

E-cadherin, TGF- β mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.01$);与氧化苦参碱中剂量组比较,氧化苦参碱低、高剂量组 ROCK-1, ROCK-2 mRNA 含量高于中剂量组 ($P < 0.01$),氧化苦参碱低、高剂量组 E-cadherin, TGF- β mRNA 含量均显著低于中剂量组 ($P < 0.01$)。见表 6。

3.7 氧化苦参碱对结肠组织 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin, TGF- β 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组结肠组织 ROCK-1, ROCK-2 蛋白表达均明显升高, E-cadherin, TGF- β 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 ROCK-1, ROCK-2 蛋白表达均明显降低, E-cadherin, TGF- β 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$);与氧化苦参碱中剂量组比较,氧化苦参碱低、高剂量组 ROCK-1, ROCK-2 蛋白明显高于中剂量组 ($P < 0.05, P < 0.01$), E-cadherin 及 TGF- β 蛋白含量显著低于中剂量组 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 7。

4 讨论

UC 因其目前病因和发病机制尚不明确,目前

表 6 氧化苦参碱对结肠组织 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin, TGF- β mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effect of Oxymatrine on mRNA levels of ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin and TGF- β in colonic tissues ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ROCK1	ROCK2	E-cadherin	TGF- β
正常	-	0.94 ± 0.06	0.91 ± 0.16	1.26 ± 0.24	1.13 ± 0.09
模型	-	4.43 ± 0.23 ¹⁾	3.69 ± 0.21 ¹⁾	0.27 ± 0.04 ¹⁾	0.22 ± 0.01 ¹⁾
氧化苦参碱	25	3.46 ± 0.04 ^{2,4)}	2.86 ± 0.16 ^{2,4)}	0.52 ± 0.03 ^{2,4)}	0.55 ± 0.03 ^{2,4)}
	50	2.75 ± 0.15 ²⁾	1.90 ± 0.07 ²⁾	0.87 ± 0.03 ²⁾	0.89 ± 0.04 ²⁾
	100	3.21 ± 0.06 ^{2,4)}	2.30 ± 0.09 ^{2,4)}	0.73 ± 0.06 ^{2,4)}	0.74 ± 0.02 ^{2,4)}
Y-27632	10	2.18 ± 0.10 ²⁾	1.61 ± 0.09 ²⁾	0.64 ± 0.02 ²⁾	0.67 ± 0.02 ²⁾

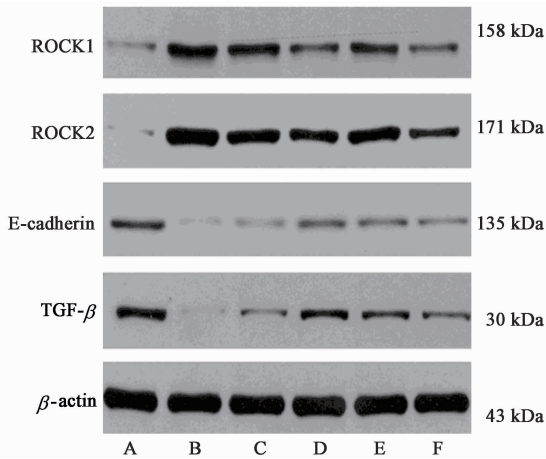


图 3 结肠组织 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin, TGF- β 蛋白表达电泳 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Electrophoresis of ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin and TGF- β in colonic tissues ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 7 氧化苦参碱对结肠组织 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin, TGF- β 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effect of Oxymatrine on protein levels of ROCK1, ROCK2, E-cadherin and TGF- β in colonic tissues ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ROCK1/ β -actin	ROCK2/ β -actin	E-cadherin/ β -actin	TGF- β / β -actin
正常	-	0.19 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.69 ± 0.02	0.56 ± 0.02
模型	-	0.77 ± 0.04 ¹⁾	0.93 ± 0.06 ¹⁾	0.04 ± 0.01 ¹⁾	0.06 ± 0.01 ¹⁾
氧化苦参碱	25	0.50 ± 0.03 ^{2,4)}	0.62 ± 0.03 ^{2,4)}	0.15 ± 0.01 ^{2,4)}	0.21 ± 0.01 ^{2,4)}
	50	0.36 ± 0.03 ²⁾	0.52 ± 0.02 ²⁾	0.51 ± 0.06 ²⁾	0.49 ± 0.06 ²⁾
	100	0.48 ± 0.06 ^{2,4)}	0.58 ± 0.04 ^{2,3)}	0.40 ± 0.04 ^{2,4)}	0.36 ± 0.04 ^{2,4)}
Y-27632	10	0.26 ± 0.03 ²⁾	0.42 ± 0.04 ²⁾	0.31 ± 0.03 ²⁾	0.28 ± 0.04 ²⁾

减少,并且大量炎症细胞浸润在黏膜和黏膜下层;而治疗组光镜下见肠壁黏膜少量炎性细胞浸润,电镜下见上皮细胞体积明显变小,细胞器明显扩张肿胀和膨胀,可见凋亡小体,主要以凋亡为主。综上,氧化苦参碱具有诱导肠上皮细胞凋亡,改善肠道炎症,促进黏膜上皮细胞修复及溃疡愈合,从而发挥缓解 UC 的效用。

EMT 是指呈现上皮样表型的细胞失去极性,

临床上缺乏有效的治疗药物,并且病情易复发,所以探究其新的发病机制和寻找新的治疗靶点成为当今研究热点之一。本研究基于氧化苦参碱的多重药理作用,通过观察对 RhoA/ROCK 信号通路以及对 E-cadherin, TGF- β 表达的影响来探究氧化苦参碱防治 UC 及其相关癌变的机制。本研究结果显示 DSS 模型组各小鼠均可出现不同程度的体质量减轻,大便质软或腹泻和肉眼可见的黏液血便,说明结肠炎模型复制成功。另外,本实验结果表明,与正常组比较,模型组小鼠 DAI 评分显著升高,结肠长度明显缩短,而经过氧化苦参碱各剂量组及抑制剂干预后,治疗组小鼠 DAI 评分显著降低,小鼠结肠长度缩短程度低于模型组,此外,氧化苦参碱中剂量组 DAI 评分显著低于低剂量及高剂量组。在光镜或电镜下,模型组结肠腺体结构排列紊乱,杯状细胞

细胞间的连接减少,肌动蛋白细胞骨架重组,细胞形态变化为纺锤状细胞^[13]。EMT 分子机制主要为相关转录因子的异常激活引起细胞基因水平上皮标志 E-cadherin, 上皮黏附分子等的缺失和间质标志波形蛋白, N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 等的过表达,并导致细胞形态发生纺锤样改变和移动能力增强的表观变化^[14-17]。而肠黏膜上皮细胞紧密连接可以阻止肠内细菌和大分子物质通过固有层,作为机体肠道保

护屏障,对于防止肠腔内细菌的入侵感染具有重要意义^[18]。ROCK 可以触发肌动蛋白重组,形成应力纤维,局灶性黏连,平滑肌收缩,增加细胞运动性,可参与细胞的收缩、迁移、增殖和凋亡等过程^[19-21]。对 IBD 动物模型的数项实验研究表明 TGF- β mRNA 缺陷型小鼠经历了更广泛的自身免疫炎症浸润的过程,涉及包括肠道在内的多个器官^[22-23]。此外,阻断 TGF- β 信号传导维持了慢性产生促炎细胞因子并加快了 IBD 的炎症过程^[24-26]。本研究发现氧化苦参碱低、中、高剂量组及 Y-27632 组结肠组织肠黏膜 ROCK-1, ROCK-2 蛋白及 mRNA 表达明显下降,而 E-cadherin 及 TGF- β 蛋白及 mRNA 表达明显升高,此外,与氧化苦参碱中剂量组比较,低剂量组和高剂量组 ROCK-1, ROCK-2 蛋白及 mRNA 含量均显著高于中剂量组, E-cadherin 和 TGF- β 蛋白和 mRNA 含量均显著低于中剂量组。一方面可能是小鼠之间的个体差异和 DSS 的自由饮用导致组间小鼠症状的严重偏差,另一方面可能是低剂量组药效不够,而高剂量组毒副作用较大。此外,与 Y-27632 组相比,氧化苦参碱缓解 UC 的症状更为显著,这可能是与氧化苦参碱的多目标靶效应相关或与抑制剂对动物的某些副作用有关。综上,氧化苦参碱能够通过 RhoA/ROCK 信号通路缓解 UC,且氧化苦参碱中剂量效果更为显著。经过 DSS 诱导的 UC 小鼠模型,用氧化苦参碱干预后,小鼠体质量,DAI 评分,结肠长度,小鼠结肠组织中 ROCK-1, ROCK-2, E-cadherin 及 TGF- β 相关指标的表达,均得到明显的改善。

综上所述,本课题组推测,氧化苦参碱可能通过下调 ROCK 表达,上调 E-cadherin 和 TGF- β 的表达,介导 EMT,从而诱导肠上皮细胞凋亡,促进肠黏膜上皮修复,抑制炎症因子的分泌来缓解 UC。

[参考文献]

[1] 孙盟朝,田晶晶,崔莉红. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎的疗效分析及对 T 淋巴细胞的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志,2018,24(5):545-549.

[2] DENG S, WANG H, FAN H, et al. Over-expressed miRNA-200b ameliorates ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice through orchestrating epithelial-mesenchymal transition and inflammatory responses by channel of Akt2 [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 61: 346-354.

[3] SONG G L, JIN C C, ZHAO W, et al. Regulation of the RhoA/ROCK/AKT/beta-catenin pathway by

arginine-specific ADP-ribosyltransferases 1 promotes migration and epithelial-mesenchymal transition in colon carcinoma[J]. Int J Oncol, 2016, 49(2): 646-656.

[4] Korol A, Taiyab A, West-Mays J A. RhoA/ROCK signaling regulates TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through MRTF-A[J]. Mol Med, 2016, 22(1): 713-723.

[5] LI M, WANG B, SUN X, et al. Upregulation of intestinal barrier function in mice with DSS-induced colitis by a defined bacterial consortium is associated with expansion of IL-17A producing gamma delta T cells [J]. Front Immunol, doi: 10.3389/fimmu.2017.00824.

[6] Richard M L, Liguori G, Lamas B, et al. Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer[J]. Gut Microbes, 2018, 9(2): 131-142.

[7] 罗爽,罗霞,刘琦,等. 大黄酸对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(11):109-113.

[8] 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.

[9] 杨佳,范恒. 复方苦参汤对溃疡性结肠炎大鼠炎症反应和氧化应激的影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32(8):3457-3461.

[10] CHEN Q, DUAN X, FAN H, et al. Oxymatrine protects against DSS-induced colitis via inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 53: 149-157.

[11] ZOU Y, MA L, ZHAO Y, et al. Inhibition of Rho kinase protects against colitis in mice by attenuating intestinal epithelial barrier dysfunction via MLC and the NF-kappaB pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(1): 430-438.

[12] Sanchez-Fidalgo S, Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, et al. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice [J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(7): 1401-1413.

[13] 马艳,刘虹,张浩,等. TGF- β 信号通路调控乳腺癌上皮-间质转化的研究进展[J]. 药学学报,2015,50(4):385-392.

[14] Demaio L, Buckley S T, Krishnaveni M S, et al. Ligand-independent transforming growth factor-beta type I receptor signalling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. J Pathol, 2012, 226(4): 633-644.

[15] Sanchez-Tillo E, LIU Y, de Barrios O, et al. EMT-

- activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(20): 3429-3456.
- [16] YANG J, Mani S A, Donaher J L, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.
- [17] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(1): 79-89.
- [18] DU L, Kim J J, SHEN J, et al. Crosstalk between inflammation and ROCK/MLCK signaling pathways in gastrointestinal disorders with intestinal hyperpermeability[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2016(5): 7374197.
- [19] Lopez-Posadas R, Becker C, Gunther C, et al. Rho-A prenylation and signaling link epithelial homeostasis to intestinal inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 611-626.
- [20] ZHANG K, ZHANG H, XIANG H, et al. TGF-beta1 induces the dissolution of tight junctions in human renal proximal tubular cells: role of the RhoA/ROCK signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(2): 464-468.
- [21] WANG Q, YANG X, XU Y, et al. RhoA/Rho-kinase triggers epithelial-mesenchymal transition in mesothelial cells and contributes to the pathogenesis of dialysis-related peritoneal fibrosis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(18): 14397-14412.
- [22] Marafini I, Zorzi F, Codazza S, et al. TGF-beta signaling manipulation as potential therapy for IBD[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(12): 1400-1404.
- [23] Skeen V R, Paterson I, Paraskeva C, et al. TGF-beta1 signalling, connecting aberrant inflammation and colorectal tumorigenesis[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(26): 3874-3888.
- [24] Monteleone G, Kumberova A, Croft N M, et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(4): 601-609.
- [25] MA Y, GUAN Q, BAI A, et al. Targeting TGF-beta1 by employing a vaccine ameliorates fibrosis in a mouse model of chronic colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(6): 1040-1050.
- [26] LI G, REN J, HU Q, et al. Oral pirfenidone protects against fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and TGF-beta signaling in a murine colitis model [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, doi: 10.1016/j.bcp.2016.08.002.

[责任编辑 孙丛丛]