

白头翁汤对溃疡性结肠炎大鼠的疗效及免疫机制的影响

钟宇¹, 郑学宝^{2*}, 叶华¹, 郭蒙¹, 吴琼¹, 迟宏罡¹, 邹颖¹, 朱宇珍^{1*}

(1. 广东医科大学, 广东 湛江 524023; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探讨白头翁汤对溃疡性结肠炎(UC)大鼠的治疗效果及免疫机制。**方法:**采用 2,4-二硝基氯苯(DNCB)加醋酸/乙醇复合法建立 UC 大鼠模型,将造模成功的大鼠随机分成模型组、美沙拉嗪组和白头翁汤高、中、低剂量组,正常大鼠为对照组。美沙拉嗪组给予美沙拉嗪($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,白头翁汤高、中、低剂量组分别给予白头翁汤($10, 5, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,其余各组给予双蒸水。连续给药 7 d 后,观察各组大鼠一般情况和疾病活动指数;大鼠麻醉后腹主动脉取血,处死大鼠,取结肠测长度,肉眼观察结肠黏膜损伤程度及大体评分;光镜下观察结肠组织病理形态学变化及病理评分;采用分光光度计比色法检测血清和结肠组织匀浆液中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO)活性;酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定血清和结肠组织匀浆液 P-选择素、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)和血栓素 B_2 (TXB_2)水平;免疫组织化学法及蛋白免疫印迹法(Western blot)技术检测结肠组织 Toll 样受体 4(TLR4)和核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组出现稀便、腹泻及血便等症状,DAI,结肠大体评分及病理学评分显著增高($P < 0.01$);白头翁汤组明显改善 UC 症状,DAI,结肠大体形态及病理学评分显著下降($P < 0.01$)。模型组血清和结肠组织中 MPO, P-选择素, MIF 和 TXB_2 的含量较正常组显著升高;白头翁汤高、中剂量组能显著降低 MPO, P-选择素, MIF 和 TXB_2 的水平。模型组结肠组织中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达量均显著高于正常组;高、中、低剂量组均能明显抑制 TLR4 和 NF- κ B 的表达。**结论:**白头翁汤可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,下调 P-选择素, MPO, MIF, TXB_2 的水平,促进肠道黏膜的修复,减轻结肠炎症反应。

[关键词] 白头翁汤; 溃疡性结肠炎; Toll 样受体 4 (TLR4); 核转录因子- κ B (NF- κ B)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0015-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190903

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190117.1415.021.html>

[网络出版时间] 2019-01-18 14:45

Efficacy and Immune Mechanism of Baitouweng Tang on Ulcerative Colitis in Rats

ZHONG Yu¹, ZHENG Xue-bao^{2*}, YE Hua¹, GUO Meng¹, WU Qiong¹,
CHI Hong-gang¹, ZOU Ying¹, ZHU Yu-zhen^{1*}

(1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effect and immune mechanism of Baitouweng Tang on ulcerative colitis (UC) rats. **Method:** The mode of UC rats was made of 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) / ethanol enema. Rats were randomly divided into control group, model group, mesalazine group, and high-dose, middle-dose and low-dose Baitouweng Tang groups. The mesalazine group were administered with mesalazine ($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Baitouweng Tang groups were given Baitouweng Tang ($10, 5, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), while the other groups were given double steaming water. After 7 days of continuous administration, the general condition and disease activity index of rats in each group were observed. After anesthesia in rats, blood was taken from the abdominal aorta. Then the rats were put to death, and the length and morphological observation of the colon were

[收稿日期] 20181005(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573932, 81603592); 东莞市社会科技发展(重点)项目(20185071501131614); 广东省医学科研基金项目(A2017005, B2017044); 广东省中医药局项目(20182072)

[第一作者] 钟宇, 硕士, 从事中药药理学研究, Tel: 0759-2388591, E-mail: zhongyu517618@163.com

[通信作者] * 郑学宝, 博士, 教授, 从事中药复方治疗消化道疾病的实验与临床, Tel: 0759-2388405, E-mail: xuebaozhenggy@126.com;

* 朱宇珍, 博士, 从事中药复方治疗消化道疾病的实验与临床, Tel: 0759-2388405, E-mail: zhuyuzhen2003@126.com

measured. Ultraviolet spectrophotometry detection was used to detect the activities of myeloperoxidase (MPO) in blood and colon tissue. The levels of P-selectin, macrophage migration inhibitory factor (MIF) and thromboxane B₂ (TXB₂) in blood and colon tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemistry and Western blot methods were undertaken to determine the expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) proteins in colon tissue. **Result:** Compared with the model group, the rats in model group showed severe symptoms, such as loose stools, diarrhea and bloody stools, while Baitouweng Tang obviously ameliorated them. Moreover, Baitouweng Tang significantly reduced DAI, colon general and pathological scores, which were high in model group ($P < 0.01$). The levels of MPO, P-selectin, MIF and TXB₂ in the serum and colon tissues of the model group were obviously increased ($P < 0.01$), and Baitouweng Tang could reverse them. Similarly, the expressions of TLR4 and NF- κ B in colons of model group were markedly higher than those in control group ($P < 0.01$). However, Baitouweng Tang group showed lower expressions than the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Baitouweng Tang could inhibit TLR4/NF- κ B signaling pathway in treatment of ulcerative colitis, and reduce the expressions of P-selectin, MPO, MIF and TXB₂, and thus promoting intestinal mucosal repair and improving intestinal function.

[Key words] Baitouweng Tang; ulcerative colitis; Toll-like receptor 4 (TLR4); nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)

溃疡性结肠炎(UC)是一种非特异性肠道炎症性疾病,其中以结肠溃疡及炎症浸润为主要病理特征。结肠黏膜损伤诱导炎症级联反应,包括中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO),巨噬细胞移动抑制因子(MIF),P-选择素和血栓素 B₂(TXB₂)等促炎细胞因子,进一步加重结肠黏膜损伤^[1-3]。炎症还会进一步加剧组织变性和抑制结肠黏膜功能恢复^[4]。核转录因子- κ B(NF- κ B)是所有动物细胞产生的最重要的炎症相关转录因子之一,参与调节许多与炎症相关的免疫应答和信号通路^[5]。NF- κ B通过细胞因子介导的巨噬细胞和淋巴细胞的分化调节炎症反应^[6-7]。此外,研究报道,NF- κ B的活化可上调包括MPO,MIF,P-选择素和TXB₂等促炎细胞因子的表达^[8],但在UC发生发展机制尚不明确。

白头翁汤源于张仲景《伤寒论》,由白头翁、黄连片、黄柏、秦皮4味药物组成。白头翁汤以白头翁清热解毒,凉血治痢为君;黄连片、黄柏、秦皮清热燥湿、泻火解毒为臣。4味合用,可增强清热止痢之功,为治疗毒热血痢之主要方剂。现代药效学研究表明白头翁汤具有抗菌、抗炎、修复溃疡、调节免疫作用及抑制肠管运动等作用^[9],但其对UC具体作用机制尚不明确。白头翁汤是否通过抑制Toll样受体4(TLR4)/NF- κ B通路起作用,尚未见报道。本研究通过研究白头翁汤对UC大鼠的MPO,P-选择素,MIF和TXB₂炎性细胞因子以及TLR4/NF- κ B通路的影响,探讨白头翁汤治疗UC的疗效及免疫机制,为中药治疗UC提供实验依据,也为治疗UC的

新药研究及UC免疫学靶点治疗提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠62只,雌雄各半,体重(200±20)g,购自广东省实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2012-0011,本次实验动物获得广东医科大学实验动物伦理委员会同意,使用许可证号SYXK(粤)2008-0007。在温度控制在20~25℃,湿度40%~70%,12h昼夜节律,每笼5只的环境下适应性饲养1周后进行实验。实验期间普通饲料喂养,所有动物自由摄食、进水。

1.2 白头翁汤配制 白头翁汤由白头翁15g,黄柏12g,秦皮12g,黄连片6g组成,单味生药购自广东医科大学附属第一医院,由该院药剂科主任中药师李向荣鉴定为正品。药物经浸泡30min后,煎煮2次,每次60min,过滤,合并2次滤液,浓缩成1g·mL⁻¹。给药量为10mL·kg⁻¹(白头翁汤的临床等效剂量为5g·kg⁻¹),4℃保存备用。

1.3 试剂 2,4-二硝基氯苯(DNCB,上海化学试剂一厂,批号200307-01);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号WS20140401);美沙拉嗪(法国爱的发制药集团,批号C14200623779);隐血试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色液,MPO酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号分别为C027,D006,A044);大鼠MIF,TXB₂,P-选择素ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为CSB-E07293r,CSB-E08047r,CSB-E07399r);鼠抗NF- κ B一抗,二抗(美国Cell

Signaling Technology 公司,批号分别为 4841,7076); 鼠抗 TLR4 一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab22048,ab13556);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BM0627);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,化学发光液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0012, P0018M)。

1.4 仪器 LRH-250-GSI 型人工气候箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司);RM2235 型组织切片机(德国莱卡公司);BM-V 型组织包埋机(湖北医用电子仪器设备公司);Elx-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);Y-FL 076652 型荧光倒置显微镜(日本尼康公司);164-5050 型电泳仪,1703930 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 UC 模型建立及给药 参照江学良等^[10]方法建立 UC 模型,大鼠适应性饲养 1 周后,禁食 24 h,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,用聚丙烯管插入肛门上段约 8 cm 后注入 $0.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNCB 乙醇(50%)液 0.25 mL,连续 2 d,第 3 天注入 8% 乙酸 2 mL,再用生理盐水 5 mL 冲洗后完成 UC 的造模。将造模成功大鼠随机分为 5 组,分别为模型组、白头翁汤高、中、低剂量组、美沙拉嗪组,其中模型组 12 只,其余各组 10 只。造模完成后的第 2 天开始,白头翁汤高、中、低剂量组分别按 1,0.5,0.25 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 灌胃给药($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),美沙拉嗪组给予美沙拉嗪 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,动物给药剂量的确定参考人的剂量换算而来,正常组和模型组给予 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 双蒸馏灌胃,连续灌胃 7 d,每日 2 次。

2.2 观察指标

2.2.1 一般情况及 DAI 评分 处死大鼠前,观察其精神状态、活动、毛色光泽、腹泻、粪便、体质量等一般情况;参照表 1 对疾病活动指数(DAI)进行评分^[11], $\text{DAI} = (\text{体质量下降分数} + \text{大便性状分数} + \text{便血分数})/3$ 。若评分越高,炎症越重。

表 1 DAI 评分

Table 1 DAI score

体质量下降/%	大便性状	隐血及便血	计分
0	正常	正常	0
1~5			1
6~10	半稀便	隐血(+)	2
10~15			3
>15	稀便	肉眼便血	4

2.2.2 结肠长度及大体形态评分 处死大鼠,取出距大鼠直肠 1 cm 处到距盲肠 1 cm 处的全部结肠,测量长度。沿肠系膜纵轴剪开肠腔,用预冷生理盐水冲去肠内容物,将其平铺展开在滤纸上,肉眼观察结肠组织变化,并参考如下标准进行大体形态评分。评分标准^[12]:黏膜无损伤,0 分;黏膜充血、水肿、中度糜烂,有单个溃疡,1 分;黏膜充血、水肿、未出现溃疡,2 分;黏膜充血、水肿、轻度糜烂,无溃疡,3 分;黏膜充血、水肿、高度糜烂,有多处溃疡,4 分;黏膜充血、水肿、重度糜烂,有 >1 cm 溃疡,5 分。

2.2.3 HE 染色观察结肠组织病理学变化及评分测定 将固定 2 cm 结肠组织按照脱水,透明,浸蜡的标准过程进行石蜡包埋,在切片机上切成 $5 \mu\text{m}$ 厚度组织片,进行 HE 染色。高倍显微镜下($\times 200$)选取视野,观察结肠组织溃疡面积、炎症浸润和结构损伤程度。HE 病理评分标准参照如下标准进行评分^[13],炎症程度:无炎症,0 分;轻度炎症,1 分;重度炎症,2 分。病变深度:无病变,0 分;病变侵及黏膜下层,1 分;病变侵及肌层,2 分;病变侵及浆膜层,3 分。隐窝损伤:无损伤,0 分;基底 1/3 隐窝被破坏,1 分;基底 2/3 隐窝被破坏,3 分;全部隐窝和上皮被破坏,4 分。病理评分 = 炎症 + 病变深度 + 隐窝损伤评分。

2.3 ELISA 检测血清及结肠组织中 MPO, P-选择素, MIF 和 TXB_2 水平 治疗周期结束后,各组大鼠禁食 24 h,次日称体质量,大鼠麻醉后腹主动脉取血于促凝管中,2 h 后 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清;快速剪碎结肠标本 0.5 g,加入冰磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液匀浆,置于匀浆器中用 9 倍生理盐水匀浆, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清。按试剂说明书检测血清和结肠组织匀浆液中 MPO, P-选择素, MIF, TXB_2 的水平。

2.4 免疫组化法检测结肠组织中 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 和 TLR4 的表达 将结肠蜡块在切片机上切成 $5 \mu\text{m}$ 厚度组织片,按常规脱蜡、梯度乙醇水化等步骤,采用复合消化液和抗原修复液进行抗原修复, PBS 缓冲液洗 3 次,用 3% 过氧化氢溶液孵育 10 min,每张切片滴加一抗 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (1:200)或 TLR4(1:200),置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。第 2 天取出,用 PBS 缓冲液洗 3 次,滴加聚合 HRP 标记抗兔 IgG $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 缓冲液冲洗, DAB 显色,常规脱水,中性树胶封片。每张切片在高倍镜下($\times 400$)进行拍照,用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 和 TLR4 的积分吸光度。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织中 NF- κ B 和 TLR4 蛋白水平 取结肠组织 10 ~ 100 mg 液氮碾碎, 加入裂解液 0.5 ~ 1 mL, 冰上裂解 30 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液。BCA 法测定蛋白后浓度, 10% SDS-PAGE 胶分离后转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。加入 NF- κ B, TLR4 一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜。第 2 天, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入二抗 (1:1 000) 室温孵育 1.5 h。继续用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。化学发光仪显影, 信号强度通过密度测定法使用软件 Gel-pro Analyzer 进行定量。以 β -actin 作为内参, 实验重复 3 次。

2.6 统计学分析 应用 Graph Pad Prism 6.0 统计

软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料应经方差齐性检验。若为方差齐性, 两组间差异采用 *t* 检验, 多组间用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 UC 大鼠一般情况及 DAI 评分的影响 治疗周期结束后, 与模型组比较, 正常组一般情况良好, 表现为反应灵敏, 活泼好动, 毛色光泽, 大便情况正常。而模型组活动量减少, 毛色晦暗, 粪便为粘液便、隐血甚至便血, 体质量下降。白头翁汤高剂量组一般情况较模型组好, 体质量下降不明显、大便性质改善, 活动增多, DAI 评分比模型组显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 白头翁汤对 UC 大鼠 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Baitouweng Tang on DAI score of UC rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	n	体质量下降/分	大便性状/分	隐血/分	活动指数
模型	-	12	3.00 ± 0.87 ¹⁾	2.24 ± 1.33 ¹⁾	2.22 ± 1.56 ¹⁾	2.88 ± 1.18
美沙拉嗪	0.5	10	2.11 ± 0.93	1.56 ± 1.33	1.33 ± 1.41	1.67 ± 1.01
白头翁汤	10	10	1.30 ± 1.16 ³⁾	0.60 ± 0.97 ²⁾	0.80 ± 1.03	0.90 ± 0.80
	5	10	1.67 ± 1.41	1.11 ± 1.45	1.33 ± 1.41	1.37 ± 1.16
	2.5	10	2.50 ± 0.92	2.25 ± 1.66	2.00 ± 1.06	2.25 ± 1.06

注: 正常组各项 DAI 评分为 0; 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (图 3 ~ 6 同)。

3.2 对 UC 大鼠结肠长度及大体形态评分的影响

与正常组比较, 模型组结肠黏膜充血水肿明显, 部分结肠与周围组织有黏连, 明显炎症溃疡病灶, 结肠长度显著缩短, 大体形态评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白头翁汤高、中剂量组结肠黏膜病变明显好转, 结肠长度较长, 大体形态评分显著降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 白头翁汤对 UC 大鼠结肠长度, 大体形态评分和病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Baitouweng Tang on colon length, general scores and pathological scores of UC rats ($\bar{x} \pm s$)

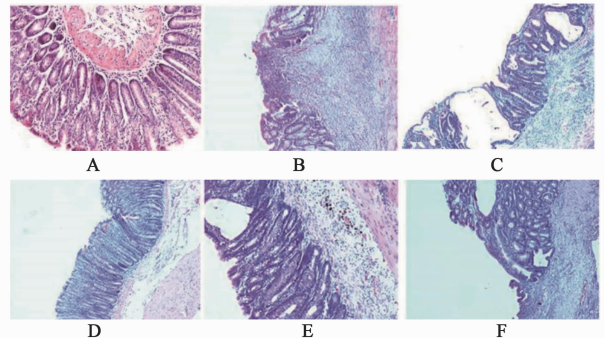
组别	剂量/g · kg ⁻¹	n	结肠长度/cm	大体形态评分/分	病理评分/分
正常	-	10	17.08 ± 1.32	0	0
模型	-	12	10.55 ± 2.04 ¹⁾	4.13 ± 0.99 ¹⁾	7.25 ± 1.28 ¹⁾
美沙拉嗪	0.5	10	13.70 ± 2.20	2.63 ± 1.06 ²⁾	4.13 ± 0.83 ³⁾
白头翁汤	10	10	15.01 ± 1.44 ³⁾	1.78 ± 0.97 ³⁾	2.11 ± 0.93 ³⁾
	5	10	12.71 ± 2.04	2.10 ± 0.88 ³⁾	2.70 ± 0.82 ³⁾
	2.5	10	13.40 ± 2.69	2.75 ± 0.71	4.38 ± 0.92 ³⁾

3.3 对 UC 大鼠结肠组织 HE 染色及病理评分的影响

正常组结肠黏膜完整, 腺体排列规则, 肌层结构正常。与正常组比较, 模型组结肠黏膜腺体受损严

重或缺失, 黏膜和黏膜下层出现大量炎性细胞 (淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞) 浸润, 甚至肌层变薄, 病理评分显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 白头翁汤高、中剂量组结肠黏膜炎症浸润、肠腺溃疡及肌层病变等病理变化有显著减轻表现, 病理评分显著低于模型组 ($P < 0.01$), 且白头翁汤高、中剂量病理评分低于美沙拉嗪组。见图 1, 表 3。

3.4 对 UC 大鼠血清和结肠组织中 MPO, P-选择素, MIF 和 TXB₂ 含量的影响 与正常组比较, 模型组血



A. 正常组; B. 模型组; C. 美沙拉嗪组; D. 白头翁汤高剂量组; E. 白头翁汤中剂量组; F. 白头翁汤低剂量组 (图 2 同)

图 1 白头翁汤对 UC 大鼠结肠组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Baitouweng Tang on colon tissue sections of UC rats (HE, ×200)

清和结肠组织匀浆液中的 MPO, P-选择素, MIF 和 TXB₂ 的含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白头翁汤不同剂量组能明显降低 MPO, P-选择素, MIF 和 TXB₂ 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.5 对 UC 大鼠结肠组织中 NF- κ B 和 TLR4 表达的影响 与正常组比较, 模型组细胞膜及细胞浆明

显黄染加深, 提示 NF- κ B 和 TLR4 表达显著增高 ($P < 0.01$); 而白头翁汤高、中、低剂量组胞膜及胞浆黄染较模型组明显变浅, 较正常组颜色稍深, 表明白头翁汤组的 NF- κ B 和 TLR4 蛋白表达减少。与模型组比较, 白头翁汤高、中剂量组 NF- κ B 和 TLR4 的表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 5。

表 4 白头翁汤对 UC 大鼠血清和结肠组织中 MPO, P-选择素, MIF 和 TXB₂ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Baitouweng Tang on level of MPO, P-selectin, MIF and TXB₂ in serum and colon tissue of UC rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	MPO/U·L ⁻¹		P-选择素/μg·L ⁻¹	
			血清	组织	血清	组织
正常	-	10	1.52 ± 0.32	1.94 ± 0.68	12.42 ± 6.55	333.89 ± 164.37
模型	-	12	3.82 ± 0.96 ¹⁾	4.20 ± 1.13 ¹⁾	46.63 ± 8.90 ¹⁾	867.21 ± 217.35 ¹⁾
美沙拉嗪	0.5	10	2.55 ± 1.16	3.70 ± 1.05	30.88 ± 8.59 ²⁾	566.36 ± 204.86 ²⁾
白头翁汤	10	10	2.19 ± 0.69 ³⁾	2.78 ± 0.71 ²⁾	19.56 ± 8.53 ³⁾	468.01 ± 167.78 ³⁾
	5	10	0.45 ± 0.96 ²⁾	3.02 ± 1.03	26.05 ± 11.05 ³⁾	649.00 ± 155.90
	2.5	10	3.19 ± 0.89	3.78 ± 0.69	30.19 ± 13.19 ²⁾	682.05 ± 201.25

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	MIF/ng·L ⁻¹		TXB ₂ /ng·L ⁻¹	
			血清	组织	血清	组织
正常	-	10	605.42 ± 206.78	2 143.02 ± 1 214.24	7.94 ± 3.10	87.18 ± 39.64
模型	-	12	1 359.70 ± 370.83 ¹⁾	6 156.53 ± 1 184.41 ¹⁾	21.82 ± 8.69 ¹⁾	211.50 ± 78.28 ¹⁾
美沙拉嗪	0.5	10	1 055.60 ± 426.13	5 078.68 ± 1 297.54	13.76 ± 4.13	153.00 ± 43.62
白头翁汤	10	10	816.76 ± 293.39 ²⁾	3 974.47 ± 1 211.62 ²⁾	11.43 ± 5.38 ²⁾	123.00 ± 54.47 ²⁾
	5	10	1 045.20 ± 428.24	4 557.72 ± 1 628.95	16.48 ± 6.98	172.70 ± 66.01
	2.5	10	1 156.30 ± 380.39	5 397.83 ± 1 306.32	18.80 ± 7.02	177.20 ± 56.68

3.6 对 UC 大鼠结肠组织中 NF- κ B 和 TLR4 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 NF- κ B 和 TLR4 表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白头翁汤高、中、低剂量组与美沙拉嗪组 NF- κ B 和 TLR4 表达均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3, 表 6。

4 讨论

中医将 UC 归为“肠癖”“大瘕泄”“久痢”“下痢”“泄泻”“休息痢”等范畴, 其发病与情志所伤, 饮食不节、感受外邪, 脾胃虚弱等因素有关。目前针对 UC 的治疗方法, 西医尚无明确的特效药, 一般采用氨基水杨酸类、糖皮质激素类、免疫抑制剂类及新兴的生物制剂^[14], 但多具有明显的不良反应, 且价格过高。中医药通过对 UC 进行辨证分型论治, 疗效好, 且复发率低、不良反应少等优点, 故临床上越来越多的患者选择使用中医药治疗, 尤其是早期和慢性 UC 患者。白头翁汤由白头翁、黄连片、黄柏、秦皮 4 味药物组成, 具有清热解毒, 凉血止痢的功效, 临床上多用于大肠湿热型 UC。药理研究表明, 4 味中药有不同程度的免疫抑制作用, 同时还可通过抑制炎症因子的释放而达到抗炎的作用^[15-17]。此外,

黄连、黄柏、秦皮提取物具有良好的抗氧化与清除氧自由基, 减轻患者肠道炎症反应, 促进肠道黏膜修复的作用^[18-19]。所以, 进一步研究白头翁汤治疗 UC 机制, 有利于寻找治疗 UC 的新靶点。

本研究采用 DNCB 加醋酸/乙醇复合建立 UC 大鼠模型, 造模结束后, 笔者发现模型组活动量减少, 毛色晦暗, 粪便为黏液便、隐血甚至便血, 体质量下降。解剖小鼠的结肠, 发现结肠缩短, 结肠黏膜充血水肿明显, 部分结肠与周围组织有黏连, 明显炎症溃疡病灶。HE 染色发现结肠黏膜腺体受损严重或缺失, 黏膜和黏膜下层出现大量炎性细胞 (淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞) 浸润等病理现象, 以上结果均表明本研究的 UC 模型造模成功。白头翁汤高、中剂量组能显著改善 UC 大鼠一般情况, 包括精神状态、毛发情况、大便形状、体质量下降等症状, 其中血便的改善尤为明显, DAI 评分显著下降。此外, 白头翁汤高、中剂量组结肠黏膜水肿和糜烂程度减轻, 病理表现见腺体排列大部分结构正常, 炎性细胞浸润明显减少。以上结果均提示白头翁汤对 UC 大鼠结肠黏膜有一定的改善和修复作用。

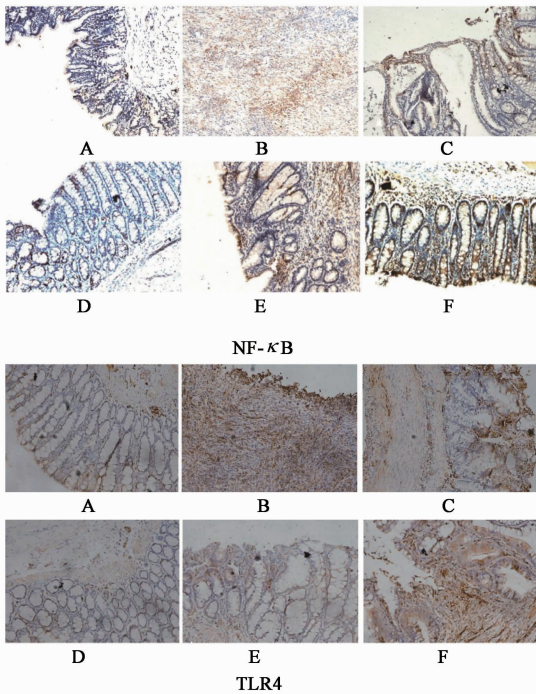


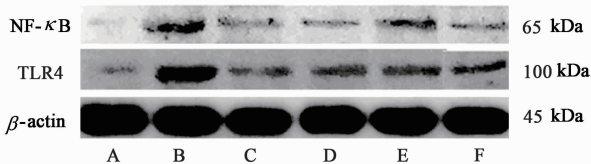
图 2 白头翁汤对 UC 大鼠结肠组织中 NF-κB, TLR4 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Baitouweng Tang on expression of NF-κB and TLR4 in colon tissue of UC rats (IHC, ×400)

表 5 白头翁汤对 UC 大鼠结肠组织中 NF-κB, TLR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Baitouweng Tang on expression of NF-κB and TLR4 in colon tissue of UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB	TLR4
正常	-	0.26 ± 0.07	0.22 ± 0.02
模型	-	0.65 ± 0.15 ¹⁾	0.61 ± 0.12 ¹⁾
美沙拉嗪	0.5	0.52 ± 0.15	0.49 ± 0.09 ³⁾
白头翁汤	10	0.35 ± 0.10 ³⁾	0.23 ± 0.03 ³⁾
	5	0.42 ± 0.08 ³⁾	0.38 ± 0.05 ³⁾
	2.5	0.59 ± 0.11	0.52 ± 0.14 ²⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 白头翁汤高剂量组; D. 白头翁汤中剂量组; E. 白头翁汤低剂量组; F. 美沙拉嗪组

图 3 大鼠结肠组织中 NF-κB, TLR4 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of NF-κB and TLR4 protein expression in colon tissue of rats

肠道组织中的 MPO 水平与 UC 肠道炎症严重程度呈正相关, 可作为 UC 患者病情严重程度的监测指标^[20]。研究表明, UC 患者及大鼠模型肠道

表 6 白头翁汤对 UC 大鼠结肠组织中 NF-κB, TLR4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of Baitouweng Tang on expression of NF-κB and TLR4 protein in colon tissue of UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB/β-actin	TLR4/β-actin
正常	-	0.001 9 ± 0.000 2	0.003 1 ± 0.000 9
模型	-	0.044 1 ± 0.005 6 ¹⁾	0.069 3 ± 0.005 7 ¹⁾
美沙拉嗪	0.5	0.021 8 ± 0.004 8 ²⁾	0.029 9 ± 0.005 7 ²⁾
白头翁汤	10	0.012 5 ± 0.003 7 ²⁾	0.018 4 ± 0.002 7 ²⁾
	5	0.012 0 ± 0.002 9 ²⁾	0.020 5 ± 0.005 5 ²⁾
	2.5	0.028 4 ± 0.004 7 ²⁾	0.034 8 ± 0.005 1 ²⁾

MPO 水平较正常组明显升高^[21]。本实验研究结果也证实了模型组血清及组织中 MPO 水平显著增加, 与疾病严重程度呈正相关。白头翁汤高、中剂量组能显著降低 UC 大鼠的 MPO 水平。P-选择素在血小板聚集、黏附和血栓的形成中扮演着重要角色。活动期和缓解期的 UC 患者血浆中 P-选择素的水平明显高于正常人, 且与疾病活动度成正相关, 提示 P-选择素在 UC 患者发病中起重要作用, 是判断 UC 病情严重程度的临床诊断指标之一^[22]。TXB₂ 水平反映血小板活化程度。研究表明, 在 UC 患者中肠系膜血管发生血管栓塞性疾病的概率比正常人高^[23], 这与血小板处于激活状态及血液高凝状态有关, 由于 UC 患者机体血小板数量增加, 血小板功能亢进, 引起结肠黏膜缺血、缺氧、坏死导致血栓形成, 血小板释放更多的炎症因子, 从而进一步加重 UC 病情进展。本研究结果显示, P-选择素和 TXB₂ 在模型组 UC 大鼠中高表达, 与前人报道一致^[22-23]。而白头翁汤高、中剂量组能显著降低血清及结肠组织中的 P-选择素和 TXB₂ 水平, 提示白头翁汤可能会抑制 UC 导致血小板聚集和活化, 从而改善 UC 缺血、缺氧结肠黏膜的微小血管循环。

TLRs 作为一个进化上保守的先天免疫受体家族, 被认为在先天免疫和炎症反应中发挥关键作用^[24]。TLR4 是哺乳动物中鉴定的第一个 TLR, 是免疫和炎症级联反应上游的核心因子。活化的 TLR4 可激活在炎症通路中起重要作用的 NF-κB, 促使多种炎症因子转录, 导致结肠黏膜损伤。研究表明 UC 上调 MIF 水平, 促进 TNF-α, IL-1β 和 IL-6 等细胞因子的释放, 激活 TLR4/NF-κB 信号通路引起炎症反应。相反, 阻断 TLR4/NF-κB 通路可减轻结肠黏膜血肿周围的炎性损伤^[25]。本实验结果显示白头翁汤高、中剂量组结肠中 TLR4 和 NF-κB 的表达明显低于模型组。笔者推测白头翁汤治疗 UC 的

作用机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关。

综上所述,本研究初步揭示了白头翁汤对 UC 大鼠结肠黏膜的结构和功能有一定的改善和修复作用,其机制可能是通过抑制 UC 大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路,减少脂质氧化产物 MPO 的产生,下调 P-选择素和 TXB₂ 的表达,抑制 MIF 介导的炎症细胞因子的过度表达,减轻结肠炎症反应,最终达到治疗 UC 的作用。这一发现为阐述中医药治疗 UC 机制提供实验依据。然而,本研究只是检测体内 MPO, P-选择素, MIF, TXB₂ 等水平变化,但据文献报道 NF- κ B 信号的活化会影响以上因子的变化,下一步本课题组将分析这些因子和 TLR4/NF- κ B 信号通路的相关性及白头翁汤的干预作用。

[参考文献]

[1] Murakami S, Tasaka Y, Takatori S, et al. Effect of *Eucommia ulmoides* leaf extract on chronic dextran sodium sulfate-induced colitis in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(6): 864-868.

[2] Bamias G, Arseneau K O, Cominelli F, et al. Mouse models of inflammatory bowel disease for investigating mucosal immunity in the intestine [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2018, 33(6):411-416.

[3] Choy M C, Visvanathan K, De Cruz P, et al. An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2017, 23(1):2-13.

[4] De Mesquita M B, Civitelli F, Levine A. Epidemiology, genes and inflammatory bowel diseases in childhood[J]. Dig Liver Dis, 2008, 40(1): 3-11.

[5] Ma B, Hottiger M O. Crosstalk between Wnt/beta-catenin and Nf-kappab signaling pathway during inflammation[J]. Front Immuno, 2016, dio:10.3389/fimmu.2016.00378.

[6] JING H, Lee S. Nf-kappaB in cellular senescence and cancer treatment[J]. Mol Cells,2014,37(3):189-195.

[7] Baker R G, Hayden M S, Ghosh S. Nf-kappab, inflammation, and metabolic disease[J]. Cell Metab, 2011,13(1):11-22.

[8] WANG Y, SUN L, SONG Z, et al. Maspin inhibits macrophage phagocytosis and enhances inflammatory cytokine production via activation of NF- κ B signaling [J]. Mol Immunol, 2017, 82: 94-103.

[9] 赵欣,恽海峰,向桂玲,等.白头翁汤加减联合双歧杆菌制剂对大鼠溃疡性结肠炎的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):110-116.

[10] 江学良,权启镇,王东,等.复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型[J].青海医学院学报,1999,20(4):1-3.

[11] Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, et al.

Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-249.

[12] Ekström G M. Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid [J]. Scand J Gastroenterol, 1998, 33(2): 174-179.

[13] Dieleman L A, Palmen 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.

[14] Probert C, Hraring S. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a ran-domised controlled trial [J]. Gut, 2003, 52(7):998-1002.

[15] 宋立武.自拟解毒凉血汤灌肠联合美沙拉嗪治疗直肠型溃疡性结肠炎的临床疗效观察[J].临床合理用药杂志,2016,9(20):51-52.

[16] 庾国桢,彭皓均,黄秀芳,等.黄连素对 α B25-35 诱导的 HT22 细胞 TLR 4/NF- κ B 信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(24):164-170.

[17] 曹世霞,祝捷,张三印,等.秦皮总香豆素对急性痛风性关节炎大鼠模型 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的影响[J].四川中医,2011,29(3):68-70.

[18] 胡天穹,邵中一,王曜.清肠化湿方联合美沙拉嗪治疗活动期轻中度溃疡性结肠炎的临床疗效[J].世界华人消化杂志,2016,24(36):4824-4829.

[19] PAN Y M, ZHU J C, WANG H S, et al. Antioxidant activity of ethanolic extract of Cortex fraxini and use in peanut oil[J]. Food Chemistry, 2007, 103(3): 913-918.

[20] Opavsky M A, Martino T, Rabinovitch M, et al. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsachievirus-induced myocarditis [J]. J Clin Invest, 2002, 109(12): 1561-1569.

[21] 王燕颖,孙丽芳,禹晶,等. MPO 与 TGF- β ₁ 在溃疡性结肠炎中的表达 [J]. 中国医师杂志,2009,11(1): 31-33.

[22] 杨权,陈守国,许宁.溃疡性结肠炎患者血浆 P 选择素的测定及其意义 [J]. 海南医学,2010,21(2): 13-14.

[23] 韩红,夏冰,曾宪昌.炎症性肠病的血栓前状态 [J]. 临床血液学杂志,2003,16(2):91-93.

[24] HAN L, LIU D L, ZENG Q K, et al. The neuroprotective effects and probable mechanisms of ligustilide and its degradative products on intracerebral hemorrhage in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 63:43-57.

[25] Roger T, David J, Glauser M P, et al. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4 [J]. Nature,2001,414(6866):920-924.

[责任编辑 周冰冰]