

溃结方对溃疡性结肠炎大鼠血清炎性反应因子与肠黏膜修复作用的研究

罗云春 易 文 姚宇宙 朱 妮

(三峡大学第一临床医学院/宜昌市中心人民医院,宜昌,443000)

摘要 目的:观察溃结方对溃疡性结肠炎(UC)大鼠炎性反应因子及 JAK2/STAT3 信号通路的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:采用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇溶液灌肠法建立溃疡性结肠炎大鼠模型,每日灌胃给予溃结方治疗,酶联免疫吸附法(ELISA 法)测定 UC 大鼠血清促炎因子 IL-6、TNF- α 及抗炎因子 IL-10、IL-4 的水平,肉眼观察大鼠结肠病理形态学改变并进行评分,免疫组织化学法(SP 法)测定结肠组织中 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达。结果:溃结方可显著降低 UC 大鼠血清 IL-6、TNF- α 水平,同时升高抗炎因子 IL-10、IL-4,差异均有统计学意义($P < 0.05$);溃结方可明显降低 UC 大鼠结肠 DAI 及 CMDI 评分($P < 0.05$),同时溃结方可减少结肠组织中 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达。结论:溃结方可调节 UC 大鼠体内促炎因子和抗炎因子的平衡,减缓炎性反应,改善 UC 大鼠结肠溃疡损伤,可能的机制是与其减少 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达相关。

关键词 溃疡性结肠炎;溃结方;炎性反应;JAK2/STAT3 信号通路

Effects of Kuijie Formula on Expression of Inflammatory Factors and Repair Intestinal Mucosa on Rat Blood Serum

Luo Yunchun, Yi Wen, Yao Yuzhou, Zhu Ni

(The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University/Yichang Center People's Hospital, Yichang 443000, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Kuijie Formula on the expression of inflammatory factors and JAK2, STAT3 in ulcerative colitis rats and to explore its mechanism. **Methods:** TNBS solution was used to build the ulcerative colitis rats models and Kuijie Formula was administrated by gavage everyday. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA) method was used to test UC rat's TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4; the pathological changes of the colon in rats was observed by naked eyes. JAK2 and STAT3 were determined by immunohistochemical staining(SP method). **Results:** Kuijie Formula can reduce the TNF- α , IL-6 levels and level up the IL-10, IL-4 in serum significantly($P < 0.05$). It can also reduce the DAI and CMDI sores of the rats' colon as well as the expression of JAK2 and STAT3 in colon tissues. **Conclusion:** Kuijie Formula can regulate the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in UC rats, slow down the inflammatory response and improve the colonic ulcer damage in UC rats. Its mechanism may be related to reducing the inflammatory response and the expression of JAK2 and STAT3.

Key Words Ulcerative colitis; Kuijie Formula; Inflammatory response; JAK2/STAT3 signal pathway

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.045

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)是一种累计结肠和直肠的非特异性炎性反应性肠病,其发病主要与细菌感染、机体免疫系统异常以及遗传等多种因素相关。UC 发病病程长,常反复发作,治愈难度大,严重者可进展为结肠癌,但相关机制尚不十分明确。研究发现,炎性反应是造成 UC 和结肠损伤的关键因素之一,其中促炎因子和抗炎因子平衡失调在 UC 发病、发展及预后中发挥着重要作用^[1-2]。目前西医对于 UC 的治疗药物主要是糖皮质激素、氨基水杨酸制剂和免疫抑制剂,但因其不良反应较多、远期疗效差等仍无法满足临床要求,而中

药治疗由于其多种优势,在治疗 UC 上越来越受到重视^[3-4]。溃结方由黄芪、白术、苍术、青黛、白头翁、败酱草、红花 7 味药物组成,通过健脾益气、活血化瘀对 UC 具有一定治疗功效,可明显缓解 UC 患者腹痛、腹泻和便血等症状^[5]。本研究采用溃结方对溃疡性结肠炎大鼠血清及结肠组织中炎性反应因子及相关蛋白表达的影响,探讨溃结方对溃疡性结肠炎的治疗效果和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体重(200 $\pm$ 20)g,从三峡大学实验动物中心购入,动物合

基金项目:湖北省中西医结合科研项目(编号:2013Z-Y16)

作者简介:罗云春(1980.12—),男,博士研究生,主治医师,研究方向:消化道肿瘤机制研究, E-mail: cuckoo7366@163.com

通信作者:易文(1970.07—),男,硕士研究生,主任医师,肛肠科主任,研究方向:中医胃肠病, E-mail: 68313786@qq.com

格证号:2013-0023。

1.2 药物 溃结方各成分均同一批次购于三峡大学附属医院。柳氮磺吡啶肠溶片 (Sulfasalazine, SASP),上海信谊药厂生成,批号 20131111,120 mg/粒,用蒸馏水配置成浓度为 0.15 g/mL 悬液。

1.3 试剂与仪器 2.4.6-三硝基苯磺酸 (TNBS),Sigma 公司;白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-10 (IL-10) ELISA 检测试剂盒,广州杰特伟生物科技有限公司;兔抗鼠 JAK-2 和 STAT-3 抗体 (美国 Santa Cruz 公司),羊抗兔二抗 (美国 Santa Cruz 公司),总蛋白提取试剂盒,BCA 蛋白定量试剂盒,4%多聚甲醛,低温高速离心机 (美国 Beckman),高速组织匀浆仪 (瑞士罗氏),全自动酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司),Olympus 倒置生物显微镜 (日本 Olympus 公司),Olympus 显微拍照系统 (日本 Olympus 公司)。

1.4 动物模型建立 SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机分为空白组,模型组,溃结方组,SASP 组,每组各 10 只,所有大鼠造模前禁食 24 h,不禁饮水。造模组大鼠采用乙醚麻醉,将外径 2.0 mm、长约 12 cm 左右的输液管(输液管先用液体石蜡油润滑),从大鼠肛门逆行插入结肠内深约 4.0 cm 处,用长约 12 cm 左右的输液管注入相应体重比例的造模剂(5% TNBS 和无水乙醇按 1:1 体积比混合),然后再注入约 0.3 mL 的空气,用棉签堵住大鼠肛门,轻揉大鼠腹部 1 min,以尽可能清除黏附在注射器和灌肠硅胶管壁上的药液,为确保注入的 TNBS 能够在大肠内弥散性分布,注入后将大鼠头向下,身体倾斜 60°,放置 1 min,造模后小鼠使仰卧,自然清醒,空白组采用同体积灭菌的生理盐水灌肠。从造模第 2 天开始灌胃给药,剂量均按人与大鼠间体表面积折算的等剂量比值表进行换算,溃结方高剂量组的剂量为 3.36 g/kg,溃结方低剂量组的剂量为 1.68 g/kg,SASP 组采用柳氮磺吡啶混悬液灌胃,剂量为 0.3 g/kg,每次灌胃体积均约为 3 mL,1 次/d,连续灌胃 21 d。模型组采用相同方式给予生理盐水。每日观察小鼠一般状况及粪便性状,采用疾病活动指数 (DAI = 体重下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数)/3 对大鼠进行评分。

1.5 标本获得与指标检测 治疗结束后取血,颈椎错位法处死大鼠,取大鼠全结肠,沿肠系膜缘纵向剖开,用经 4℃预冷的生理盐水冲洗干净,将结肠组织放入固定液中固定,肉眼观察结肠标本并进行评分。

取结肠典型病变组织置于福尔马林液中固定,标本经乙醇脱水,石蜡包埋,切片染色,职称病理切片,置于显微镜下观察并进行图像分析。血清 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平采用 ELISA 试剂盒测,操作过程严格按 ELISA 试剂盒说明书进行。结肠组织中 JAK2 及 STAT3 表达情况:取适量结肠组织用 0.9%生理盐水制成匀浆,粉碎肠黏膜组织中细胞,离心取上清液,采用免疫组织化学法 (SP 法) 检测 JAK2 和 STAT3 的表达,以 PBS 缓冲液代替一抗作为空白对照,以已知阳性标本作为阳性对照。

1.6 Western Blot 采用蛋白提取试剂盒提取不同处理组别结肠组织总蛋白,利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,配置 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,以 40 μ g 的上样量进行上样,以 60 V 和 100 V 恒压电泳,湿转移至 PVDF 膜上,将 PVDF 膜放入封闭液中室温封闭 1 h。分别加入 1:200 稀释后的兔抗鼠抗体,4℃孵育过夜, PVDF 膜经 TBST 洗涤 3 次后,加入 1:2000 的羊抗鼠二抗,于室温下摇床孵育 1 h,经显色后进行 X 线胶片感光、显影和定影,并利用 Quantity One 图像处理软件进行图像分析。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组间比较采用 *t* 检验或方差分析,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况 各建模组大鼠在造模后当天出现大便松软、腹泻、活动进食减少及隐血试验阳性等现象,部分大鼠可观察到血便,一周内大鼠体重下降明显,大鼠肠壁明显增厚,肠外壁发生黏连,黏膜充血且可观察到明显糜烂和溃疡。肉眼观察正常对照组大鼠肠黏膜纹理清晰,未见糜烂溃疡病变;大鼠在灌胃给药前 DAI 和 CMDI 评分显著高于空白组 (*P* < 0.05),经用药治疗后,溃结方组和 SASP 组 DAI 及 CMDI 评分显著下降,与模型组相比差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 溃结方对溃疡性结肠炎大鼠 DAI 评分及 CMDI 评分的影响

组别	鼠数	DAI		CMDI
		给药前	给药后	
正常对照组	10	0.29 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.10	0.36 $\pm$ 0.13
模型组	10	3.07 $\pm$ 0.24 [△]	2.91 $\pm$ 0.41 [△]	2.77 $\pm$ 0.38 [△]
溃结方组低剂量组	10	3.11 $\pm$ 0.27*	1.42 $\pm$ 0.23*	1.21 $\pm$ 0.27*
溃结方组高剂量组	10	3.07 $\pm$ 0.19*	1.11 $\pm$ 0.22*	1.06 $\pm$ 0.21*
SASP 组	10	3.04 $\pm$ 0.22*	1.28 $\pm$ 0.26*	1.20 $\pm$ 0.25*

注:与空白组比较[#]*P* < 0.05,与模型组比较**P* < 0.05。

表 2 溃结方对大鼠血清炎症反应因子的影响

组别	鼠数	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IL-4 (ng/mL)	IL-10 (ng/mL)
正常对照组	10	126.55 ± 11.64	149.22 ± 18.37	118.32 ± 6.21	67.44 ± 3.77
模型组	10	367.31 ± 19.23 [△]	589.41 ± 14.96 [△]	48.33 ± 7.98 [△]	43.71 ± 3.86 [△]
溃结方组低剂量组	10	213.39 ± 14.33 [*]	357.10 ± 18.33 [*]	72.55 ± 7.47 [*]	57.28 ± 3.01 [*]
溃结方组高剂量组	10	177.31 ± 13.22 [*]	307.73 ± 16.79 [*]	90.33 ± 7.33 [*]	62.31 ± 2.99 [*]
SASP 组	10	191.28 ± 16.71 [*]	322.17 ± 21.46 [*]	85.12 ± 5.78 [*]	60.77 ± 3.71 [*]

注:与空白组比较[#]*P* < 0.05,与模型组比较^{*}*P* < 0.05。

2.2 溃结方对模型大鼠血浆中炎症反应因子水平的影响 ELISA 检测结果显示,模型组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 水平明显上升,与正常对照组相比差异具有统计学意义(*P* < 0.05),模型组血清 IL-4 和 IL-10 水平显著低于正常对照组(*P* < 0.05),经溃结方治疗后,大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平显著下降,IL-4 和 IL-10 水平显著上升,差异均具有统计学意义(*P* 均 < 0.05)。

2.3 溃结方对 UC 大鼠结肠组织 JAK2 和 STAT3 蛋白表达的影响 经灌胃给药治疗后,模型组大鼠结肠组织 JAK2 水平相比于正常对照组显著升高(*P* < 0.05),而溃结方组和 SASP 组大鼠结肠组织中 JAK2 水平相比于模型组显著降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。模型组 STAT3 蛋白表达量显著高于正常对照组,经溃结方治疗后 STAT3 蛋白表达明显下降(*P* < 0.05),且溃结方组下降程度大于 SASP 组(*P* < 0.05)。

表 3 各组大鼠结肠组织 JAK2 和 STAT3 蛋白表达的影响

组别	鼠数	JAK2 (pg/mL)	STAT3/βactin
正常对照组	10	223.51 ± 32.12	0.29 ± 0.09
模型组	10	584.22 ± 30.79 [#]	1.37 ± 0.11 [#]
溃结方组低剂量组	10	368.27 ± 19.68 [*]	0.97 ± 0.08 [*]
溃结方组高剂量组	10	298.47 ± 18.58	0.89 ± 0.07
SASP 组	10	315.22 ± 22.47 [*]	1.11 ± 0.08 [*]

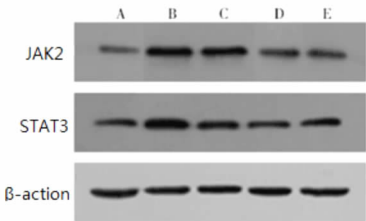


图 1 各组大鼠结肠组织 JAK2 和 STAT3 蛋白表达电泳图
注:A、B、C、D、E 分别表示正常对照组,模型组,溃结方组低剂量组,溃结方组高剂量组和 SASP 组。

3 讨论

溃疡性结肠炎是一种病因复杂的慢性肠道疾病,肠道菌群和免疫功能的紊乱被认为是 UC 发生的主要机制。在 UC 发病过程中,由于促炎因子和

抗炎因子平衡的失调,可导致多种细胞因子水平的变化,这些细胞因子是 UC 产生肠道非特异性反应的关键环节,对于研究 UC 的发病机制具有重要作用。IL-6 和 TNF-α 是 2 种常见的促炎性反应细胞因子,可对血小板活化因子(PAF)、白三烯(LT)和一氧化氮(NO)的分泌产生诱导作用,进而使肠黏膜炎性反应加剧,引起肠道损伤^[6-7],多项研究表明,IL-6 和 TNF-α 在促进 UC 肠道黏膜炎性反应的扩大中发挥了重要作用^[8]。IL-4 和 IL-10 是 2 种抗炎因子,可通过对激活的单核细胞、巨噬细胞及其所产生细胞因子和趋化因子的抑制作用,减少多种促炎因子的释放,从而发挥抑制和终止炎性反应的功能^[9-10]。研究发现,IL-10 可下调 TH₁ 细胞反应各种相关的细胞因子的转录,抑制活化的单核细胞和巨噬细胞分泌炎性反应因子,同时对脂多糖诱导的单核细胞 NF-κB 的活化具有抑制作用^[11-12]。Scarpa 等临床研究发现,UC 患者在发病早期,其体内促炎因子水平显著上升,且高于抗炎因子水平,经药物治疗后,抗炎因子逐渐上升而促炎因子开始下降,最终炎性反应消退,病情缓解并痊愈^[13]。

中医认为 UC 是基本病机是脾气虚弱,致病因素是湿热之邪,而瘀血阻滞则是 UC 久病不愈的重要原因^[14-15]。溃结方是临床上使用广泛的一种重要方剂,方剂组成由清热解毒(胡黄连、黄柏、芦根、天花粉、苦参),健脾益气(党参、白术、茯苓、甘草),活血化瘀(当归、红花、丹参)3 组药物,该方剂与 UC 的病征具有针对性治疗效果。本研究结果显示溃结方可有效降低 UC 大鼠肠黏膜损伤指数 DAI 和 CM-DI,改善大鼠的营养状况和生命体征,说明溃结方可有效修复 UC 大鼠肠黏膜损伤。经溃结方治疗后,UC 大鼠血清促炎因子 IL-6 和 TNF-α 水平显著降低(*P* < 0.01),同时抗炎因子 IL-10 和 IL-4 水平显著升高(*P* < 0.01),说明溃结方可有效调节肠道菌群失调,通过抑制促炎因子 IL-6 和 TNF-α 的表达及促进抗炎因子 IL-10 和 IL-4 的表达,减轻肠道炎性反应,进而促进肠溃疡组织的恢复。

JAKs 家族是一类不同类型的非受体型络氨酸蛋白激酶。JAK2 作为 JAKs 家族的重要成员之一,其结构与 JAKs 家族具有高度的同源性,且在体内广泛分布,多存在与体细胞的胞质中。JAK2 可与 STAT 家族多个成员(如 STAT3、STAT5)构成信号转导通路,通过这些信号通路,JAK2 可直接或间接参与多种细胞的生命过程,并与某些炎症反应的发生具有密切相关性^[16]。有研究表明,JAK2 可影响 IL-6 介导的肾小管上皮细胞分化过程,而 JAK2/STAT3 信号转导通路通过调节细胞的黏附作用,对肾上皮细胞的增殖具有诱导作用,进而促进肾细胞的纤维化^[17]。本研究结果显示,UC 大鼠肠黏膜中 JAK2 蛋白的表达量显著上调,经溃结方药物治疗后,JAK2 表达均有不同程度下降,其中高剂量组和 SASP 组下降最为显著。这提示了 JAK2 可能参与了溃疡性结肠炎的发生过程,且 JAK2 的表达水平可能与疾病的严重程度相关,而溃结方可有效地抑制肠黏膜上 JAK2 蛋白的表达,这提示了其可能是通过对 JAK2/STAT3 信号通路的调节作用,来发挥抗炎的目的。

STAT3 是一种广泛参与机体免疫反应和炎症反应的信号分子,同时也参与细胞的增殖和凋亡等过程。临床研究发现,UC 患者肠黏膜中 STAT3 蛋白表达水平上升,且其表达主要集中在炎症反应区域,在正常黏膜组织中表达量并未显著上升,表明 STAT3 参与了溃疡性结肠炎肠黏膜的炎症反应^[18]。近年来研究表明,在溃疡性结肠炎和结直肠癌中,均能发现 JAK/STAT 信号通路的激活,而 IL-6、EGF 和瘦素是激活 STAT3 的细胞因子^[19]。Piodi 等通过给予大鼠 JAK 和 STAT 特异性抑制剂,观察大鼠肠黏膜炎症反应,发现 JAK/STAT 抑制剂可有效阻断 JAK/STAT 信号通路并缓解大鼠结肠炎^[20]。本研究分析发现,模型组大鼠 STAT3 表达显著高于其他各组,经药物灌胃治疗后,溃结方组和 SASP 组 STAT3 表达均下降,其中溃结方组下降程度最为显著,这提示了溃结方可能通过作用与 JAK2/STAT3 信号通路来发挥抗炎效果。

综上所述,溃结方可通过下调 UC 小鼠 JAK2 及 STAT3 的水平,抑制相关信号通路活性的表达,调节促因子 IL-6、TNF-和 α 抗炎因子 IL-10、IL-4 之间的平衡,减轻炎症反应的发生,进而促进肠黏膜组织修复,从整体上改善溃疡性结肠炎消化吸收障碍和免疫机制紊乱等症状,为探讨溃疡性结肠炎的中西医结合治疗的机制提供一定理论基础。

参考文献

- [1] 聂欣宁. 中药灌肠加内服治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 中国医药,2012,7(11):1467.
- [2] 闫曙光,周永学,惠毅,等. 乌梅丸拆方对 TNBS 诱导大鼠溃疡性结肠炎治疗作用的研究[J]. 中华中医药杂志,2012,27(4):890-895.
- [3] 林巧嫦,廖博贤,黄飞娜. 白细胞介素 IL-4、IL-17 在溃疡性结肠炎中的表达[J]. 中国医药科学,2012,2(16):44-45.
- [4] 郑笑涛. 溃结方灌肠联合美沙拉嗪口服治疗溃疡性结肠炎 48 例[J]. 中国中医药现代远程教育,2014,12(17):56-57.
- [5] 何爱明,林董,林世明等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜的 CINC-1 及其受体 CXCR2 表达的作用[J]. 复旦学报:医学版,2010,37(3):310-314.
- [6] 黄芸,董蕾. 马齿苋对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中国中药杂志,2011,36(19):2727.
- [7] 薛雷,张大伟,姜广兵,等. 美沙拉嗪联合中药汤剂治疗溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2014,23(13):1420-1422.
- [8] 李梅,高艳景,崔祥华,等. 前列腺素受体 EP2 在溃疡性结肠炎黏膜中的表达及临床意义[J]. 山东大学学报:医学版,2012,50(11):79-83.
- [9] 王怡薇,张会会,王彦礼,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 STAT3 调控作用研究[J]. 药学报,2015(1):21-27.
- [10] 常东,刘子志,汪栋材,等. 溃结灵联合柳氮磺胺吡啶片对大肠湿热型溃疡性结肠炎患者 NO 及 IL-13 的影响[J]. 中国中医急症,2014,23(3):432-433,482.
- [11] 李玉生. 溃疡性结肠炎患者血清 PGE2、PAF 水平变化及其临床意义[J]. 实用临床医药杂志,2010,14(11):17-18,21.
- [12] 苗新普,欧阳钦,韦红. COX-2、PPAR γ 和 STAT3 在溃疡性结肠炎组织中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志,2010,18(25):2660-2665.
- [13] Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C, et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: a review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(22):6774-6785.
- [14] 王晓娟,张晓明,徐洪雨,等. 塞来昔布对大鼠溃疡性结肠炎的作用[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2013,22(6):501-504.
- [15] 邹君君,朱莹,张晓江,等. 溃结宁膏穴位敷贴对脾肾虚型溃疡性结肠炎的临床疗效及其对血清 γ 干扰素、白细胞介素 4 的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2013,21(6):305-307.
- [16] 史伟,葛文松. 健脾溃结方对脾虚性溃疡性结肠炎患者免疫功能影响的分析[J]. 中国实用医药,2007,2(9):60-62.
- [17] 刘璐平,张晓艳. 溃结方治疗脾虚湿热瘀滞型慢性非特异性溃疡性结肠炎临床观察[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(3):70-71.
- [18] Im E, Jung J, Pothoulakis C, et al. Disruption of Pten speeds onset and increases severity of spontaneous colitis in Il10(-/-) mice[J]. Gastroenterology, 2014, 147(3):667-679, e10.
- [19] Piodi LP, Poloni A, Ulivieri FM. Managing osteoporosis in ulcerative colitis: Something new? [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(39):14087-14098.
- [20] 王铭慧,李玉华,曹晓媛,等. 溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育,2011,9(24):170-175.