

# 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜TLR4蛋白水平的作用

杜群, 李红, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉

## ■背景资料

肾上腺皮质激素类药物和氨基水杨酸类药物治疗UC已有几十年历史, 目前仍是治疗UC的一线药物。虽有一些治疗UC新药问世, 但由于疗效及毒副作用问题, 只能作为二、三线药物使用。中药对UC有较好的治疗效果, 毒副作用小, 应用前景广阔, 但作用机制不明确严重限制了其推广使用。

杜群, 王汝俊, 李燕舞, 巫燕莉, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405

李红, 广州中医药大学中药学院 广东省广州市 510006  
王文君, 广州中医药大学临床药理研究所 广东省广州市 510405

国家自然科学基金资助项目, No. 30400613

作者贡献分布: 杜群与李红对此文所作贡献均等; 此课题由杜群, 李红, 王汝俊及王文君设计; 研究过程由杜群, 李红, 王文君, 李燕舞及巫燕莉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杜群提供; 数据分析由杜群及李红完成; 本论文写作由杜群及李红完成。

通讯作者: 杜群, 510405, 广东省广州市机场路12号大院, 广州中医药大学脾胃研究所. duqun@gzhtcm.edu.cn

电话: 020-36585555

收稿日期: 2007-09-30 修回日期: 2008-01-15

## Effect of Kuijieling Decoction on protein level of Toll-like receptor 4 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis

Qun Du, Hong Li, Ru-Jun Wang, Wen-Jun Wang, Yan-Wu Li, Yan-Li Wu

Qun Du, Ru-Jun Wang, Yan-Wu Li, Yan-Li Wu, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Hong Li, College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Wen-jun Wang, Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30400613

Correspondence to: Dr. Qun Du, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. duqun@gzhtcm.edu.cn

Received: 2007-09-30 Revised: 2008-01-15

## Abstract

**AIM:** To observe the protein level changes of Toll-like receptor 4 (TLR4) as well as the effects of Kuijieling Decoction (KD) on TLR4 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis (UC).

**METHODS:** Rat UC model was induced by trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS). The rats were randomly divided into normal control (NC) group, model control (MC) group, Kuijieling low dose (KLD) group, Kuijieling medium dose (KMD) group, Kuijieling high dose (KHD)

group and salazossulfapridine (SASP) group. The rats were killed to get their colonic mucosa and extract the whole-cell protein after 10 days of treatment. Western blot was performed to detect the protein level of TLR4.  $\beta$ -actin was used as an internal index. Relative expression of target protein was calculated from the gray scale ratio of target protein and  $\beta$ -actin.

**RESULTS:** The relative protein expression of TLR4 was significantly higher in the MC group than in the NC group ( $0.843 \pm 0.201$  vs  $0.472 \pm 0.072$ ,  $P < 0.01$ ). The relative protein expression of TLR4 was significantly lower in the KHD group than in the MC group ( $0.620 \pm 0.178$  vs  $0.843 \pm 0.201$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** TLR4 may be involved in the pathogenesis of UC, and KD can inhibit the relative protein expression of TLR4 in colonic mucosa of rats with UC induced by TNBS. The inhibitory effects of KD on UC might be associated with the inhibition of protein expression of TLR4.

**Key Words:** Kuijieling Decoction; Ulcerative colitis; Toll-like receptor 4; Trinitrobenzen-sulphonic acid; Western blot

Du Q, Li H, Wang RJ, Wang WJ, Li YW, Wu YL. Effect of Kuijieling Decoction on protein level of Toll-like receptor 4 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 522-525

## 摘要

**目的:** 观察溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠黏膜Toll样受体4(TLR4)的变化特点及溃结灵对TLR4的影响。

**方法:** 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法制作UC大鼠模型, 大鼠随机分为6组: 正常对照组、模型对照组、溃结灵低、中、高剂量组、阳性药柳氮磺胺吡啶(SASP)组。治疗10 d后处死大鼠取新鲜结肠黏膜标本提取全细胞蛋白, 采用蛋白免疫印迹(Western blot)方法对TLR4的蛋

## ■同行评议者

陈治水, 主任医师, 解放军第二一医院中医科

白表达水平进行检测, 以 $\beta$ -actin作为内参, 以目的蛋白与 $\beta$ -actin密度的比值作为目的蛋白的相对含量并进行统计学分析。

**结果:** 模型组TLR4蛋白相对表达量明显高于正常组( $0.843 \pm 0.201$  vs  $0.472 \pm 0.072$ ,  $P < 0.01$ ); 溃结灵高剂量组TLR4相对表达量明显低于模型组( $0.620 \pm 0.178$  vs  $0.843 \pm 0.201$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** TLR4可能参与了UC大鼠的发病过程, 溃结灵使TNBS法UC大鼠模型结肠黏膜TLR4的蛋白表达水平明显降低, 这可能是其治疗UC作用的机制之一。

**关键词:** 溃结灵; 溃疡性结肠炎; Toll样受体4; 三硝基苯磺酸; 免疫印迹法

杜群, 李红, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜TLR4蛋白水平的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 522-525

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/522.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称非特异性溃疡性结肠炎, 是一种慢性直肠和结肠炎性疾病, 病机复杂, 病因尚不明确, 与多种因素相关, 其中免疫因素是主要方面. 随着免疫学和分子生物学等学科的迅速发展, 通过抑制Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)/核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)通路的关键分子进而阻断UC过激的炎症反应已成为众多学者研究的方向。

脾胃研究所在多年临床实践的基础上, 以清热健脾活血为治则, 总结出治疗UC疗效较满意的中药复方溃结灵<sup>[1]</sup>, 前期实验研究<sup>[2-3]</sup>采用三硝基苯磺酸(trinitrobenzen sulphonic acid, TNBS)灌肠成功复制了UC大鼠模型, 并发现溃结灵对TNBS法UC大鼠模型有明显的治疗作用; 采用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法观察溃结灵对UC大鼠结肠黏膜NF- $\kappa$ B P65蛋白表达的作用, 发现TNBS所致大鼠UC的发生与NF- $\kappa$ B的活化密切相关, 溃结灵对UC大鼠模型过度激活的NF- $\kappa$ B有抑制作用. 为了进一步研究溃结灵对UC的作用机制, 本研究观察了溃结灵对TNBS法UC大鼠模型结肠黏膜TLR4蛋白表达水平的影响, 以期对溃结灵治疗UC的较深层次的作用机制进行探讨。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\delta$  SD大鼠由广东省医学实验动物中心提供(合格证号: 粤监证字2005A010), 体质量180-220 g, SPF级环境饲养. 溃结灵药材购于采芝林连锁药店, 经广州中医药大学中药学院中药标本中心张秋镇老师鉴定, 所购药材均符合中华人民共和国药典标准. 按组方比例称取药材, 常规方法制备水煎液. 大鼠低、中、高剂量按成人用量的5倍、10倍、20倍计算, 即4.6 g(生药量, 下同)/kg、9.2 g/kg、18.3 g/kg, 药物用蒸馏水配成460 g/L、920 g/L、1830 g/L. 柳氮磺胺吡啶(SASP, 上海三维制药有限公司, 每片0.25 g): 用作阳性对照药物, 大鼠用量取10倍成人用量即0.5 g/kg, 药物用蒸馏水配成50 g/L. 5% TNBS(Sigma公司), 全细胞蛋白提取试剂盒(Active motif公司), BCA-100蛋白质定量测定试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司), 预先染色的蛋白分子量标准品(Marker, Fermentas life Sciece公司), 兔抗TLR4多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology公司), 兔抗 $\beta$ -Actin多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司), 显色法免疫检测试剂盒(Invitrogen公司), ZFMQ050PE型超纯水器(Millipore公司), 3K-30Z型高速冷冻离心机(Sigma公司), A5002型酶联免疫检测仪(Tecan公司), Mini Protean 3 cell型凝胶电泳装置(Bio-Rad公司), Power PAC 1000型电泳仪(Bio-Rad公司), DYY-40B型电转移装置(北京市六一仪器厂), TS-1型脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司), GS-800型光密度扫描仪(BIO-RAD公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模:** 采用TNBS灌肠法制作UC大鼠模型<sup>[2,4]</sup>. 取3 mo SD大鼠, 造模型前禁食24 h, 留取部分动物作为正常对照组, 其余大鼠乙醚麻醉, 用大鼠灌胃针头轻轻从肛门插入, 深度为8 cm, 推入TNBS溶液(含25 mL/L TNBS和500 mL/L乙醇)4 mL/kg体质量, 捏紧肛门平放5 min即可, 术后常规饲养。

**1.2.2 给药和标本留取:** 造模后d 3, 模型动物分为空白对照组, 溃结灵低、中、高剂量组和阳性药SASP组, 并同时开始按上述剂量给药, 给药体积为10 mL/kg. 空白对照组及正常对照组给等体积蒸馏水, 每天1次, 连续10 d. 末次给药24 h后, 脱颈椎法处死大鼠, 取距肛门8 cm结肠, 沿纵轴剪开, 刮取结肠黏膜组织, 即置于液氮中, -70℃保存。

## ■研发前沿

通过活化Toll样受体, 激活NF- $\kappa$ B, 进而引起持续扩大的炎症反应是近年来UC发病机制研究的新发现, 相关研究受到广泛重视, 针对TLRs/NF- $\kappa$ B通路开展UC的治疗研究是当前研制抗UC新药热点, 把这一新进展引入中药研究中, 对揭示抗UC中药的深层次作用机制及开发高水平中药有积极作用。

## ■创新盘点

通过抑制Toll样受体表达量, 抑制NF- $\kappa$ B活化, 进而治疗UC可能是中药发挥抗UC作用的部分机制. 本文从Toll样受体表达角度探讨清热健脾活血治则的中药方剂治疗UC的作用机制, 尚未见类似的文献报道。

## ■应用要点

TLRs/NF- $\kappa$ B通路调控众多基因的转录,能在一个较高水平发挥调控细胞因子水平总环节的作用,对其进行研究会明显增加药物研究的有效性和针对性,突破以往研究模式,本文对中药抗UC作用机制研究有借鉴意义。

1.2.3 Western blot方法检测结肠黏膜TLR4蛋白水平:取结肠黏膜按试剂盒说明书提取全细胞蛋白,用BAC-100蛋白质定量测定试剂盒测定蛋白浓度,取100  $\mu$ g蛋白在100 g/L十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)恒压198 V 40 min后,取下凝胶进行4℃湿法过夜转移至尼龙膜上,参考Western blot试剂盒说明书及文献[5]进行免疫检测,室温下封闭90 min,洗膜2次,加入TLR4一抗(稀释度为1:400)4℃摇床上孵育24 h,用抗体清洗液洗膜4次,加入二抗摇床上孵育2 h,洗膜4次,用DAB显色法在1 h内完成显色并照相。同时 $\beta$ -actin作为内参。用光密度扫描仪对蛋白含量进行密度分析,以目的蛋白与 $\beta$ -actin的密度比值作为目的蛋白的相对含量。

**统计学处理** 结果以mean $\pm$ SD表示,组间两两比较,采用 $t$ 检验分析。

## 2 结果

TNBS法UC模型大鼠结肠黏膜TLR4蛋白相对含量明显高于正常组,溃结灵高剂量组和SASP组的TLR4蛋白相对含量明显低于模型组(图1,表1)。

## 3 讨论

UC与克隆病(crohn's disease, CD)合称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), UC是一种慢性直肠和结肠炎性疾病,病变主要位于结肠的黏膜层,以溃疡为主,多累及直肠和远端结肠,也可遍及整个结肠。UC病因与发病机制尚不十分明确,但与宿主遗传易感性、机体免疫应答及肠黏膜免疫识别失调密切相关<sup>[6]</sup>,可以认为UC是有遗传易感性患者肠黏膜系统免疫调节性疾病,免疫反应异常是其发病中的重要环节<sup>[7]</sup>。

TLRs是近十多年来发现的天然免疫受体,既在抗感染免疫及先天性免疫中起关键作用,也是重要的获得性免疫的调节因子<sup>[8-9]</sup>。他使人类重新认识并定位了机体天然免疫系统在免疫始动环节及调控中的重要作用,因而被誉为“免疫学领域的重大突破”<sup>[10]</sup>。该受体族作为机体炎性反应链的启动蛋白,从源头为炎症性疾病的发病机制的研究提供了新的方向。至今已克隆出人的TLRs家族成员共11个<sup>[8,11]</sup>,并被证明可以识别各种病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)<sup>[12]</sup>。其中TLR4与宿主的免疫功能有着密切的联系,可识别不同类型的病原分子。TLR4的特异性配体主

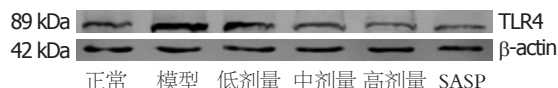


图1 Western blot法检测大鼠TLR4蛋白的表达情况。

表1 溃结灵对UC大鼠结肠黏膜TLR4蛋白表达的影响(mean $\pm$ SD)

分组	n	剂量(g/kg)	TLR4相对含量
正常组	6	等体积水	0.472 $\pm$ 0.072
模型组	10	等体积水	0.843 $\pm$ 0.201 <sup>b</sup>
溃结灵治疗组低剂量	8	4.6	0.762 $\pm$ 0.153
溃结灵治疗组中剂量	8	9.2	0.694 $\pm$ 0.160
溃结灵治疗组高剂量	8	18.3	0.620 $\pm$ 0.178 <sup>c</sup>
SASP组	8	0.5	0.581 $\pm$ 0.152 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 模型组。

要为内毒素中的类脂A、热休克蛋白等,供体病原体具有特异性,如革兰氏阴性菌、厌氧菌、致密螺旋体和藤黄微球菌等。

TLRs识别病原体后,向细胞内传递活化信号,激活NF- $\kappa$ B等转录因子,进而调节炎症递质的产量,导致IBD炎症黏膜的损伤。正常肠道对自身的菌群是耐受的,这些菌群不会引起正常肠道的免疫反应,肠上皮细胞持续表达TLR3和TLR5,而TLR4则几乎无法测到,这使得肠上皮细胞对正常的肠道共生细菌及其毒力成分不应答,但在IBD中TLR4的表达呈显著上调,而发生对自身菌群耐受缺失<sup>[13]</sup>。TLRs对肠腔内PAMPs进行模式识别,经一系列信号传导分子最终促发NF- $\kappa$ B的激活, NF- $\kappa$ B的激活导致肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)转录增加,而体外实验发现TNF- $\alpha$ 、IL-1能上调肠上皮TLR4的表达<sup>[14-15]</sup>,又进一步激活NF- $\kappa$ B。因此TLR4在结肠组织中高表达是UC发病过程中的关键环节,也是UC治疗研究中极受重视的靶位。如髓样分化蛋白-2(myeloid differential protein-2, MD-2)是TLR4介导NF- $\kappa$ B激活必需的膜表面分子,其糖基化是关键步骤。TLR4-MD2抑制剂tunicamycin能阻止MD-2N端糖基化,明显下调NF- $\kappa$ B活性<sup>[16]</sup>。TLR4的中和性抗体MTS510能识别TLR4-MD2复合体,阻断NF- $\kappa$ B的激活及TNF- $\alpha$ 的产生<sup>[17]</sup>。

前期研究<sup>[18]</sup>采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法观察溃结灵对TNBS法UC大鼠模型结肠黏膜TLR4基因表达的作用,发现UC大鼠



模型组TLR4基因相对表达量明显高于正常对照组, 溃结灵高剂量组TLR4的基因相对表达量均明显低于模型组。本实验结果表明, UC大鼠模型组TLR4蛋白相对表达量明显高于正常对照组, 溃结灵高剂量组TLR4蛋白的相对表达量均明显低于模型对照组, 这与前期研究的结果相一致。研究表明, TLR4的高表达与UC的发病密切相关, 这与文献报道的一致<sup>[5,19]</sup>, 同时溃结灵对TNBS法UC大鼠过量表达的TLR4有下调作用, 这可能是溃结灵抑制NF- $\kappa$ B活性并治疗UC的作用机制之一。

#### 4 参考文献

- 1 黄志新, 劳绍贤, 崔琦珍, 王汝俊, 胡旭光. 溃结灵颗粒治疗活动期溃疡性结肠炎的临床与实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 141-143
- 2 杜群, 李红, 王建华, 王汝俊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠治疗作用的病理学观察. 中药新药与临床药理 2007; 18: 173-175
- 3 杜群, 李红, 王建华, 王汝俊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠粘膜NF- $\kappa$ B p65蛋白表达及血清TNF- $\alpha$ 含量的影响. 广州中医药大学学报 2007; 24: 396-399
- 4 郑礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究. 中国药理学通报 1998; 14: 370-372
- 5 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003; 170: 3977-3985
- 6 郑家驹. 我国溃疡性结肠炎发病机制研究. 中华消化杂志 2005; 25: 637-638
- 7 巫协宁. 炎症性肠病的发病机制新解. 国外医学·消化系疾病分册 2004; 24: 323-325
- 8 Kelly D, Conway S. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol Immunol* 2005; 42: 895-901
- 9 Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 12-19
- 10 Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001; 166: 7128-7135
- 11 O'Neill LA. Immunology. After the toll rush. *Science* 2004; 303: 1481-1482
- 12 Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 2005; 26: 469-476
- 13 Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616
- 14 Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Arditi M. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 20431-20437
- 15 Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* 2003; 71: 3503-3511
- 16 陈维雄. 应加强炎症性肠病发病机制及治疗的研究. 国外医学·消化系疾病分册 2003; 23: 259-260
- 17 Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3471-3475
- 18 李红, 杜群, 王文君, 王汝俊, 王建华, 刘珊珊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠粘膜Toll样受体2、4基因表达的影响. 中药材 2007; 30: 56-59
- 19 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Kazumori H, Yuki T, Mishima Y, Moriyama I, Kadota C, Oshima N, Amano Y, Kadowaki Y, Ishimura N, Kinoshita Y. Epithelial toll-like receptor 5 is constitutively localized in the mouse cecum and exhibits distinctive down-regulation during experimental colitis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 132-138

#### ■同行评价

本文研究选题新颖, 所用技术手段先进, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽