

溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜NF- κ B DNA结合活性的作用

李红, 杜群, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉

李红, 广州中医药大学中药学院 广东省广州市 510006
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
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: 李红与杜群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; 研究过程由李红, 杜群, 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; 数据分析由李红及杜群完成; 本论文写作由李红及杜群完成.
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 DNA binding activity of nuclear factor kappa B in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis

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

Hong Li, College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China
Qun Du, Ru-Jun Wang, Yan-Wu Li, Yan-Li Wu, Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Wen-Jun Wang, Clinical Pharmacology Institute, 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, Spleen and Stomach Institute, 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 changes of DNA binding activity of NF- κ B as well as the effects of Kuijieling Decoction(KD)on DNA binding activity of NF- κ B in colonic mucosa of ulcerative colitis (UC)model rats.

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 salazosulfapridine (SASP) group. The rats were killed to get their fresh colonic mucosa and extract nuclear proteins after 10 days of treatment. Relative activity of NF- κ B was detected by ELISA with a Trans AM TM NF- κ B p65 kit.

RESULTS: The relative activity of NF- κ B was significantly higher in the MC group than in the NC group (0.440 ± 0.119 vs 0.261 ± 0.042 , $P < 0.01$). The relative activity of NF- κ B was significantly lower in the KHD and SASP groups (0.261 ± 0.056 and 0.269 ± 0.106) than in the MC group (0.440 ± 0.119 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: NF- κ B may be involved in the pathogenesis of UC, and KD can inhibit the relative activity of NF- κ B in colonic mucosa of rats with UC induced by TNBS. The inhibitory effects of KD on UC might be associated with the inhibition of NF- κ B activity.

Key Words: Kuijieling Decoction; Ulcerative colitis; Rat model; Nuclear factor- κ B

Li H, Du Q, Wang RJ, Wang WJ, Li YW, Wu YL. Effect of Kuijieling decoction on DNA binding activity of nuclear factor kappa B in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 663-666

摘要

目的: 观察溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠黏膜核因子- κ B(NF- κ B)DNA结合活性的变化特点及溃结灵对其的影响。

方法: 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法制作UC大鼠模型, 大鼠随机分为以下六组: 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核蛋白, 利用以ELISA为基础的Trans AM TM NF- κ B p65试剂盒检测NF- κ B相对活性并进行统计学分析。

■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。

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科; 江学良, 主任医师, 济南军区总医院消化科

■相关报道

Schreiber *et al*报道UC患者核内NF- κ B DNA结合活性明显升高. 治疗UC的经典用药肾上腺皮质激素和水杨酸类的药理作用新机制已被提出, 即能抑制NF- κ B活性. Murano *et al*采用NF- κ B p65蛋白反义核苷酸喂饲DSS结肠炎小鼠后, 小鼠的疾病活动指数明显改善, IL-1等细胞因子水平明显下降.

结果: 模型组结肠黏膜NF- κ B相对活性明显高于正常组(0.440 ± 0.119 vs 0.261 ± 0.042 , $P < 0.01$); 溃结灵高剂量组和SASP组结肠黏膜NF- κ B相对活性(0.261 ± 0.056 , 0.269 ± 0.106)明显低于模型组($P < 0.01$).

结论: NF- κ B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NF- κ B相对活性明显降低, 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; 大鼠模型; 核因子- κ B

李红, 杜群, 王文俊, 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NF- κ B DNA结合活性的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 663-666

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/663.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, 与克隆病(crohn's disease, CD)合称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD). UC可发生于任何年龄, 与结肠癌的发病有关, 且病程长, 病变程度轻重各异, 由于病因不明, 临床上常常表现反复发作而治愈难度大, 被世界卫生组织列为现代难治病之一. 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^[1], 实验研究发现该方的水提取液有明显的抗炎镇痛作用^[2].

随着近年对核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的研究, 正逐步揭示着IBD的发病机制, 通过抑制NF- κ B进而阻断IBD过激的炎症反应, 已成为众多学者研究的方向. 为了进一步研究溃结灵对UC的作用机制, 前期研究^[3]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, 本研究在此基础上观察溃结灵对UC大鼠结肠黏膜NF- κ B的DNA结合活性的影响, 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 ♂ 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, 批号: 200410001, 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), 核蛋白提取试剂盒(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), TransAM TM NF- κ B ELISA测定试剂盒(Active motif 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).

1.2 方法

1.2.1 造模^[3-4]: 采用TNBS灌肠法制作UC大鼠模型. 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 给药方法与标本留取: 造模后第3天, 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, 每只大鼠刮取50 mg新鲜结肠黏膜后立即提取核蛋白.

1.2.3 采用以ELISA为基础的Trans AM TM NF- κ B p65试剂盒检测NF- κ B的DNA结合活性: 取新鲜结肠黏膜按试剂盒说明书提取细胞核蛋白, 用BAC-100蛋白质定量测定试剂盒测定蛋白浓度, 取核蛋白抽提物5 μ g并用细胞裂解液稀释至20 μ L, 加于预包被有NF- κ B特异的寡核苷酸双链探针的96孔板中, 于室温振荡(100 r/min)反应1 h, 洗板3次, 加稀释的NF- κ B p65单抗(稀释浓度为1:1000)100 μ L/孔, 室温反应1 h; 洗板后加稀释的辣根过氧化物酶交联的二抗(稀释浓度为1:1000)100 μ L/孔, 室温反应1 h; 洗板后加四甲基联苯胺底物液避光显色10 min; 加终止液终

止, 于全自动酶标仪450 nm处读吸光度(A), 以A值大小表示被测样品NF- κ B DNA结合活性的相对值. 阳性对照孔中加入试剂盒提供的Jurkat核蛋白2.5 μ g/孔. 在实验中设置竞争性对照, 以示检测的特异性: 特异性竞争抑制试验在加样孔中加入20 pmol/孔的野生型NF- κ B寡核苷酸双链针; 非特异竞争抑制试验则加入突变型寡核苷酸双链针, 其余步骤同前.

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

竞争性试验表明NF- κ B与目的片段结合有高度特异性. 实验结果显示模型组大鼠结肠黏膜NF- κ B的相对活性明显高于正常组, 溃结灵高剂量组、SASP组NF- κ B的相对活性明显低于模型组(表1).

3 讨论

细胞因子和细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAM)在UC发病中的作用已得到公认, 近年研究发现NF- κ B调控着UC患者细胞因子和CAM的释放, 从而参与了UC肠道的炎症和免疫反应, NF- κ B在IBD的发生发展中占举足轻重的地位^[5].

NF- κ B是与免疫球蛋白重链和 κ 轻链基因增强子序列(5'-GGGACTTTCC-3')特异结合的核蛋白因子. 在哺乳动物细胞中有两组共五种Rel/NF- κ B家庭成员: NF- κ B1(p50)、NF- κ B2(p52)为一组, 另一组包括RelA(p65)、RelB、c-Rel, 其中RelA(p65)具有显著的促炎活性^[6]. 这两组蛋白成员间可形成同源或异源二聚体. 最常见的二聚体是p50-p65异源二聚体, 也就是常说的NF- κ B^[7].

NF- κ B是在进化学上高度保守的一种转录因子, 广泛存在于各种组织中, 能与许多细胞基因的启动子和增强子中的 κ B转录序列位发生特异性结合, 参与众多免疫炎症反应有关的基因转录调控以及细胞凋亡、肿瘤细胞的黏附和转移等多种生理病理过程的基因调控, 参与多种包括IBD在内的多种炎症性疾病的发病. NF- κ B可以调控任何含有 κ B位点的基因转录, 包括细胞因子及其受体、CAM、促进或抑制凋亡蛋白、急性期反应蛋白、趋化分子、酶分子、转录因子等^[8-9]. 对IBD起主要致病作用的细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-

表 1 溃结灵对UC大鼠结肠黏膜NF- κ B DNA结合活性的作用(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	剂量(g/kg)	NF- κ B活性(A)
正常组	6	等体积水	0.261 \pm 0.042
模型组	8	等体积水	0.440 \pm 0.119 ^b
溃结灵治疗组			
低剂量	7	4.6	0.394 \pm 0.047
中剂量	7	9.2	0.344 \pm 0.081
高剂量	8	18.3	0.261 \pm 0.056 ^d
SASP组	8	0.5	0.269 \pm 0.106 ^d

^b P <0.01 vs 正常组; ^d P <0.01 vs 模型组.

α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)等在转录水平由NF- κ B调控^[10]. NF- κ B对CAM、趋化因子、环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)、一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等表达均有调控作用. 因此, NF- κ B在IBD的病理生理过程中可能起到枢纽作用. 研究表明, UC患者核内NF- κ B DNA结合活性明显升高^[11-12], 在UC患者中, NF- κ B已被活化并进入核内, 具有很强的与基因 κ B位点相结合的能力, 是细胞因子转录及释放的前提和关键. 而且绝大多数细胞因子基因启动子或增强子部位均有NF- κ B结合位点, 因此活化入核的NF- κ B即可与之结合并促进这些细胞因子的转录.

随着对NF- κ B的深入研究, 以此为靶标进行的IBD的治疗研究也已成为当前研究的热点, 通过抑制NF- κ B进而阻断UC过激的炎症反应已成为众多学者研究的方向. 许多临床经典用药如肾上腺皮质激素类(adrenal cortical hormones)、SASP及水杨酸类药物的药理作用新的机制已被提出, 即能抑制NF- κ B活性, 进而减少炎症前细胞因子而起到治疗UC的作用. 一些NF- κ B抑制剂也正在临床或实验研究, 如白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)可削弱TNF- α 诱导的I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)活性^[13], IL-4可能抑制NF- κ B的核转位^[14], 抗氧化剂、蛋白酶体抑制剂也是抑制NF- κ B激活的一条非特异性途径, 但在IBD中的应用和疗效尚需进一步的研究. 针对这一通路的基因治疗的研究也正在开展, 已证实UC患者肠黏膜NF- κ B含有p65这一重要的亚单位, 他在调控靶基因的转录中起着关键性的作用, 因此采用靶向NF- κ B p65的反义寡核苷酸抑

■创新盘点

本文观察了清热健脾活血治则中药复方溃结灵对UC大鼠模型结肠黏膜NF- κ B p65蛋白DNA结合活性的影响, 发现溃结灵对UC大鼠模型过度激活的NF- κ B有抑制作用, 揭示了其治疗UC的部分机制, 尚未见类似的文献报道.

■应用要点

以往的中药抗UC的作用机制研究多从免疫角度尤其是细胞因子角度进行探讨, 但参与UC发病的细胞因子数量众多, 机制极其复杂, TLRs/NF- κ 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.

■同行评价

本文研究内容新颖,分析严谨,具有一定的学术价值。

制或封闭p65 mRNA的表达,减少p65蛋白的合成,从而减少细胞因子的释放,对于治疗UC具有十分重要的治疗价值。Murano *et al*^[15]发现采用p65反义寡核苷酸喂饲右旋葡聚糖硫酸(dextran sulfate sodium, DSS)结肠炎小鼠后,小鼠的疾病活动指数(disease activity index, DAI)明显改善,IL-1、IL-6、TNF- α 水平明显下降,Western blot检测发现NF- κ B p65蛋白表达明显减少。Probert *et al*^[16]在离体的UC患者固有层单个核细胞(lamina propria mononuclear cells, LPMC)的研究中发现:p65反义寡核苷酸可以明显降低NF- κ B p65的表达,在人体细胞上证实了p65反义寡核苷酸的药用价值,为p65反义寡核苷酸作为UC治疗新药提供了实验依据。由于NF- κ B在UC发病中的重要作用,抗UC中药对NF- κ B激活的研究成为当前研究的热点,抑制NF- κ B激活可能是部分中药作用的机制。

本研究表明,UC模型大鼠NF- κ B DNA结合活性明显高于正常对照组,溃结灵高剂量组NF- κ B DNA结合活性明显低于模型对照组,表明TNBS所致大鼠UC的发生与NF- κ B的活化密切相关,溃结灵对UC大鼠模型过度激活的NF- κ B有抑制作用,这可能是溃结灵治疗UC大鼠的作用机制之一。

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 胡旭光, 王汝俊, 杜群, 巫燕莉. 溃结灵的抗炎与镇痛作用研究. 现代中西医结合杂志 2003; 12: 128-129
- 3 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
- 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 张可, 邓长生, 朱尤庆. NF- κ B与炎症性肠病. 国外医学·消化系疾病分册 2003; 23: 94-96
- 6 Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683
- 7 黄文林, 朱孝峰. 信号传导. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 138
- 8 吴礼国, 欧阳钦, 甘华田. Rel/NF- κ B信号传导通路与溃疡性结肠炎生物治疗策略的关系. 国外医学·消化系疾病分册 2004; 24: 335-337
- 9 Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* 2005; 118: 4589-4592
- 10 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
- 11 甘华田, 欧阳钦, 陈友琴, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 κ 基因结合核因子的活化及抗炎药物的作用. 中华医学杂志 2002; 82: 384-388
- 12 刘一品, 李延青. 核因子- κ B的表达在溃疡性结肠炎发病机制中的意义. 胃肠病学 2006; 11: 103-106
- 13 Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 31868-31874
- 14 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2: 998-1004
- 15 Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- 16 Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, Kuhbacher T, Ghosh S, Arnott ID, Forbes A. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* 2003; 52: 998-1002

编辑 李军亮 电编 郭海丽