

# 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- $\kappa$ B p65的影响

范恒, 段雪云, 庄雄, 吕建芳, 寿折星

## ■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)的发病机制与免疫异常有关, 具有免疫调节作用的细胞因子在UC的发病过程中起重要作用。许多细胞因子的产生可能与NF- $\kappa$ B的信号转导和转录激活因子有关。NF- $\kappa$ B活化可能是UC发生发展的关键点。

范恒, 庄雄, 吕建芳, 寿折星, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022

段雪云, 湖北中医学院附属医院药剂科 湖北省武汉市 430061

中国博士后科学基金资助项目, No. 2005037679

作者贡献分布: 此课题由范恒设计; 研究过程由范恒、段雪云、庄雄、吕建芳、寿折星操作完成; 数据分析及论文写作由范恒完成。

通讯作者: 范恒, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科. fanheng009@yahoo.com.cn  
电话: 027-85726395

收稿日期: 2007-12-11 修回日期: 2008-02-08

## Effect of Wumeiwan on NF- $\kappa$ B p65 in colon tissue of rats with ulcerative colitis

Heng Fan, Xue-Yun Duan, Xiong Zhuang, Jian-Fang Lv, Zhe-Xing Shou

Heng Fan, Xiong Zhuang, Jian-Fang Lv, Zhe-Xing Shou, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Xue-Yun Duan, Department of Medicament, the Affiliated Hospital of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Supported by: the Postdoctor Science Foundation of China, No. 2005037679

Correspondence to: Dr. Heng Fan, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fanheng009@yahoo.com.cn

Received: 2007-12-11 Revised: 2008-02-08

## Abstract

**AIM:** To compare the effects of Wumeiwan (WMW) and solfasalazine (SASP) on NF- $\kappa$ B p65 in colon tissue of rats with ulcerative colitis (UC) and to analyze their mechanism of action.

**METHODS:** A model of UC was induced by administration of dinitro-chlorobenzene (DNCB) and acetic acid. Fifty-six SD rats (28 males and 28 females) were randomly divided into normal control group ( $n = 14$ ), model group ( $n = 14$ ), SASP group ( $n = 14$ ), and WMW group ( $n = 14$ ). Changes of NF- $\kappa$ B p65 in rat colon tissue were observed after treatment with DNCB and acetic acid.

**RESULTS:** NF- $\kappa$ B p65 was not expressed or weakly expressed in normal colon tissue. The positive expression rate of NF- $\kappa$ B p65 was significantly higher in WMW and SASP groups than in normal control group ( $26.32\% \pm 9.65\%$ ,  $31.23\% \pm 5.18\%$  vs  $45.67\% \pm 4.2\%$ ,  $P < 0.01$ ). The positive expression rate of NF- $\kappa$ B p65 was significantly lower in WMW group than in model group. There were significant differences between WMW and SASP groups ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** NF- $\kappa$ B is closely related with the development of UC. WMW can treat UC by suppressing the activity of NF- $\kappa$ B p65.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Experiment research; Necrosis factor- $\kappa$ B p65; Wumeiwan

Fan H, Duan XY, Zhuang X, Lv JF, Shou ZX. Effect of Wumeiwan on NF- $\kappa$ B p65 in colon tissue of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 896-899

## 摘要

**目的:** 比较乌梅丸与西药柳氮磺胺吡啶SASP组对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- $\kappa$ B p65疗效的大小, 并分析其作用机制。

**方法:** 应用2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立UC大鼠模型, 将56只健康SD大鼠(雌雄各半), 按雌雄随机分4组, 分别为乌梅丸组、SASP组、模型组和正常组, 分别观察治疗后大鼠结肠黏膜组织匀浆NF- $\kappa$ B p65的变化。

**结果:** 在正常结肠组织中NF- $\kappa$ B p65无或仅有弱阳性表达, 模型组结肠黏膜组织NF- $\kappa$ B p65阳性细胞表达率明显高于正常组( $45.67\% \pm 4.25\%$  vs  $10.45 \pm 5.20$ ,  $P < 0.05$ ), 乌梅丸( $26.32\% \pm 9.65\%$ )和SASP( $31.23\% \pm 5.18\%$ )组阳性细胞率则明显低于模型组, 乌梅丸组阳性细胞率较SASP组更低。

**结论:** NF- $\kappa$ B与UC发病关系密切, 乌梅丸可能通过抑制NF- $\kappa$ B p65活性调节免疫功能达到

## ■同行评议者

陈治水, 主任医师,  
解放军第二一  
医院中医科

治疗的目的。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 溃疡性结肠炎; NF- $\kappa$ B p65; 乌梅丸

范恒, 段雪云, 庄雄, 吕建芳, 寿折星. 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- $\kappa$ B p65的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 896-899  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/896.asp>

## 0 引言

许多证据表明, 循环和肠道局部细胞因子表达异常是UC发病的重要机制之一<sup>[1-6]</sup>, 许多与此密切相关的细胞因子基因启动子或增强子部位均有 $\kappa$ B位点, NF- $\kappa$ B在核内与 $\kappa$ B序列结合促进多种炎性细胞因子如IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 及TNF- $\beta$ 等的基因转录<sup>[7]</sup>. 所以, NF- $\kappa$ B活化可能是UC发生发展的关键点, 本实验主要观察乌梅丸对UC大鼠组织NF- $\kappa$ B p65的影响, 以探讨乌梅丸治疗UC的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 药物及其制备: 乌梅丸组成药物及剂量如下: 乌梅16 g、细辛6 g、干姜10 g、黄连16 g、当归4 g、附子6 g、蜀椒4 g、桂枝6 g、生晒参6 g、黄柏6 g. 乌梅丸方药物按传统方法配制含生药浓度分别为0.515 g/mL的水煎剂. 西药柳氮磺胺吡啶(SASP)批号为: 200111002, 由上海三维制药公司生产(250 mg/片). 柳氮磺胺吡啶药物制备: 将88片SASP用研钵研细, 用100目筛筛过, 然后再研, 配成0.026 kg/L混悬液。

1.1.2 试剂: 兔抗大鼠NF- $\kappa$ B p65 mAb, 美国NeoMakers公司生产, 批号: 9034P501D. 免疫组化试剂盒, 晶美生物工程有限公司生产, 批号: DEC 022005, 包括: 封闭液, 为100 mL/L山羊血清和抗兔生物素化二抗HRP标记链亲合素均为即用型; DAB底物缓冲液, 20 $\times$ 浓溶液; DAB显色液, 20 $\times$ 浓溶液; DAB底物溶液, 20 $\times$ 浓溶液. EDTA抗原修复液(pH9.0), 50 $\times$ 浓缩液, 用蒸馏水稀释后使用。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组: 将SD健康大鼠56只(雌雄各半, 体重300 $\pm$ 50 g), 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 按雌雄随机分4组, 各组均为14只(雌雄各半), 第4组为正常组, 对第1、2、3进行造模, 分别为乌梅丸组、SASP组和

模型组, 各组体质量统计学比较无显著性差异( $P>0.05$ ).

1.2.2 模型制备: 应用2,4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立UC大鼠模型<sup>[9-10]</sup>. 将大鼠颈背部用100 g/L Na<sub>2</sub>S脱毛后, 以20 g/L DNCB丙酮液0.25 mL(5滴)滴背, 1次/d, 连续14 d, 在d 15以直径3 mm导尿管经肛门插入结肠8 cm处, 注入0.1% DNCB乙醇0.25 mL, 在d 16同部位注入80 mL/L醋酸溶液2 mL, 准确计时10 s后, 再用5 mL生理盐水冲洗. 再饲养2 wk, 30 d后造模完成。

1.2.3 给药方法: 乌梅丸组: 每只大鼠分别用上配制的乌梅丸液 3 mL ig, 每天一次; SASP组: 该组每只大鼠用SASP混悬液3 mL, 每天一次; 模型组、正常组: 每组每只大鼠均以蒸馏水3 mL灌胃, 每天一次, 以上均给药15 d。

1.2.4 标本处理及切片染色: 于d 16分别断头处死全部大鼠, 剖结肠标本, 将需要做免疫组化的标本, 经多聚甲醛固定, 然后在0.1MPBS4 $^{\circ}$ C中过夜, 换液1次. 750 mL/L 乙醇90 min, 950 mL/L 乙醇90 min, 1000 mL/L乙醇90 min换3次, 1000 mL/L二甲苯60 min换2次. 石蜡包埋后, 切片37 $^{\circ}$ C干燥过夜. 切片染色严格按试剂盒操作步骤进行。

1.2.5 NF- $\kappa$ B p65表达结果判断: 所有切片均在同一条件的光学显微镜下观察. 结果以胞核或胞质中发现棕黄色或褐色颗粒状物者为阳性细胞, 阴性对照应无棕黄色反应产物. 采用以下染色积分评价标准<sup>[8]</sup>: 在40倍高倍镜下选取典型视野计数100个细胞, 其中阳性细胞数作为NF- $\kappa$ B p65计数值, 并以百分率表示。

**统计学处理** 采用SPSS10.0软件处理其数据资料, 结果以mean $\pm$ SD表示, 进行 $t$ 检验。

## 2 结果

2.1 模型检测 每天连续观察大鼠大便性状、饮食、毛发、活动状态等, d 16后, 可见大鼠逐渐产生典型UC活动期症状, d 30后(造模完成), 每组随机抽取大鼠2只, 处死后取其结肠, 病理确认结肠出现的充血、水肿、炎细胞浸润、隐窝脓肿、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化。

2.2 UC大鼠NF- $\kappa$ B p65表达 大多数NF- $\kappa$ B的阳性染色都表现在核内, 而仅有少量的NF- $\kappa$ B阳性细胞表现为胞质着色. 呈弥漫或颗粒性分布, 多呈深棕黄色或褐色、粗颗粒状分布。

### ■应用要点

本文为深入探讨UC中NF- $\kappa$ B激活的信号传导途径和自身调节过程, 为寻找和研究阻断活化的特异性抑制剂, 为进一步研究提供指导, 将为阐明UC发病机制及治疗带来新的希望。

## ■同行评价

本文研究工作有一定科学性,具有一定的参考价值。

表 1 乌梅丸对UC大鼠NF- $\kappa$ B p65表达的影响(mean  $\pm$  SD, %)

分组	n	阳性细胞率
正常组	10	10.45 $\pm$ 5.20 <sup>b</sup>
模型组	7	45.67 $\pm$ 4.25
SASP组	8	31.23 $\pm$ 5.18 <sup>b</sup>
乌梅丸组	7	26.32 $\pm$ 9.65 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs SASP组; <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组。

2.3 乌梅丸对UC大鼠NF- $\kappa$ B p65表达的影响 在正常组织NF- $\kappa$ B p65无或仅有弱阳性表达, 模型组肠黏膜组织NF- $\kappa$ B阳性细胞表达率明显高于正常组, 乌梅丸和SASP组阳性细胞率则明显低于模型组(P<0.01), 乌梅丸组阳性细胞率则明显低于SASP组(P<0.05, 表1)。

### 3 讨论

研究发现, 已有100余种基因(包括细胞因子、黏附分子、免疫性受体、促、抑凋亡蛋白等)均可被NF- $\kappa$ B调控<sup>[11-12]</sup>。NF- $\kappa$ B家族由5个成员构成<sup>[9,13]</sup>, 包括NF- $\kappa$ B1(p50/p105), NF- $\kappa$ B2(p52/p100), p65(ReIA), ReIB及C-Rel等。根据他们的跨域激活能力分为两组, 第一组具有转录活性ReIA(p65), ReIB和c-Rel, 第二组不具有转录活性NF- $\kappa$ B1(p50)和NF- $\kappa$ B(p52), 其中ReIA(p65)具有显著的促炎活性<sup>[14]</sup>。在静息状态下, NF- $\kappa$ B二聚体与IKB单体偶联, 以无活性的形式存在于细胞质中, NF- $\kappa$ B只有在炎症状态下, 才能被活化, 而NF- $\kappa$ B p65具有显著的促炎活性。

Schreiber *et al*<sup>[12]</sup>采用Western blot及电泳迁移率改变法(EMSA)发现在UC患者肠活检组织核提取物中的NF- $\kappa$ B p65蛋白水平明显增高, 他能与B淋巴细胞中免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链基因增强子 $\kappa$ B序列(GGGACTTTCC)特异性结合并具有转录调节活性, 故被命名为核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)。研究表明, NF- $\kappa$ B是在进化中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 $\kappa$ B转录序列特异结合, 启动或调节相关基因转录, 在免疫和炎症反应、细胞生长、病毒感染及某些疾病急性期反应等方面起重要作用<sup>[14-22]</sup>。已有资料表明UC中NF- $\kappa$ B活性增高的同时伴有IL-1、IL-6, TNF- $\alpha$ 等水平上升。IL-1, TNF- $\alpha$ 可促进NF- $\kappa$ B进一步活化, 后者通过正反馈使IL-1、TNF- $\alpha$ 分泌更加增多, 同时使其他细胞因子IL-6, IL-8等表达也增加, 产生级联反应, 使炎症过程得到放大和持续。

近来有不少研究发现致炎细胞因子和抗炎细胞因子的功能、数量之间的平衡可能与核因子的活化、信号转导和转录激活因子等有关。其中NF- $\kappa$ B是一种能与多种基因启动子或增强子部位 $\kappa$ B位点发生特异性结合并促进其相关基因转录的核因子。NF- $\kappa$ B是调节细胞因子(IL-1、IL-8等)表达的主要和基本因子, 在UC的发病机制中起着重要的作用。

研究表明肠道局部炎症损伤是UC重要的病理基础及NF- $\kappa$ B活化的基础, 多种炎症因子参与了病理损伤过程, 也有研究显示<sup>[23]</sup>, NF- $\kappa$ B与UC关系密切。在UC中, NF- $\kappa$ B被诱导剂激活, 调节炎症递质的产量, 进而导致UC炎症黏膜的损伤, NF- $\kappa$ B可能在其中发挥枢纽作用<sup>[24]</sup>。因此, 我们可以推测在UC的发病过程中, NF- $\kappa$ B活化在复杂的细胞因子网络失调中可能是一中心环节。

我们的研究显示, 在UC大鼠中, NF- $\kappa$ B活性增高, 提示NF- $\kappa$ B与UC发病关系密切, 在UC的发生、发展中占有重要地位, 对肠组织中炎症细胞因子等基因转录的调控可能是其作用的机制之一, 其表达水平可能有助于病情活动性的观察与判断, 可以作为评价病情活动性的指标之一, 其表达量也可以作为评价UC肠道病理损害的指标之一。乌梅丸能抑制NF- $\kappa$ B p65活性, 从而使溃疡性结肠炎大鼠免疫功能恢复正常, 达到治疗的目的。但NF- $\kappa$ B在UC中的具体作用机制尚不十分清楚, NF- $\kappa$ B在UC中活化及调节过程以及对炎症因子表达调控的具体过程等尚有待于进一步研究。

### 4 参考文献

- 1 Brown KA, Back SJ, Ruchelli ED, Markowitz J, Mascarenhas M, Verma R, Piccoli DA, Baldassano RN. Lamina propria and circulating interleukin-6 in newly diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2603-2608
- 2 Sasaki M, Jordan P, Houghton J, Meng X, Itoh M, Joh T, Alexander JS. Transfection of IL-10 expression vectors into endothelial cultures attenuates alpha4beta7-dependent lymphocyte adhesion mediated by MAdCAM-1. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 3
- 3 Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Tamura K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T. IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14: 111-116
- 4 Ito H, Hirotsu T, Yamamoto M, Ogawa H, Kishimoto T. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease. *J*



- Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14: 56-61
- 5 Schmidt C, Marth T, Wittig BM, Hombach A, Abken H, Stallmach A. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002; 70: 177-183
  - 6 Lochner M, Forster I. Anti-interleukin-18 therapy in murine models of inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002; 70: 164-169
  - 7 Sen P, Wallet MA, Yi Z, Huang Y, Henderson M, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Baldwin AS Jr, Tisch RM. Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells. *Blood* 2007; 109: 653-660
  - 8 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
  - 9 Fan H, Qiu MY, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Chen R. Effects of four regulating-intestine prescriptions on pathology and ultrastructure of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4800-4806
  - 10 范恒, 邱明义, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠中药方对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡及其调控基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1119-1124
  - 11 Dikopoulos N, Schmid RM, Bachem M, Buttenschoen K, Adler G, Chiang JY, Weidenbach H. Bile synthesis in rat models of inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 222-230
  - 12 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
  - 13 Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
  - 14 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484
  - 15 Matsunaga T, Hokari S, Koyama I, Harada T, Komoda T. NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 313-319
  - 16 Huang WC, Chen JJ, Chen CC. c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKKbeta is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 9944-9952
  - 17 Zaninoni A, Imperiali FG, Pasquini C, Zanella A, Barcellini W. Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2003; 31: 185-190
  - 18 Chen YM, Tu CJ, Hung KY, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS. Inhibition by pentoxifylline of TNF-alpha-stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF-kappa B down-regulation. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 950-958
  - 19 Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Role of nuclear factor-kappa B activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 894-900
  - 20 Calder VL, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kappaB. *Scand J Immunol* 2003; 57: 261-270
  - 21 Clermont F, Adam E, Dumont JE, Robaye B. Survival pathways regulating the apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha in primary cultured bovine endothelial cells. *Cell Signal* 2003; 15: 539-546
  - 22 Rakonczay Z, Jarmay K, Kaszaki J, Mándi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takács T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709
  - 23 Nosti-Escanilla MP, Pena AS. NF-kappa B and inflammatory intestinal diseases. *Rev Esp Enferm Dig* 1998; 90: 113-119
  - 24 甘华田, 欧阳钦, 陈友琴, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 $\kappa$ 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

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

**本刊讯** 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)