

复方青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠NF- κ B P65、TNF- α 表达的影响

杜立阳, 陈铭诗, 刘清芳, 程晓磊, 李鲜明

■背景资料

复方青黛颗粒是中国医科大学附属第一医院中医科用于治疗溃疡性结肠炎(UC)的协定处方, 经30多年临床应用疗效显著。

杜立阳, 陈铭诗, 刘清芳, 程晓磊, 李鲜明, 中国医科大学附属第一医院中医科 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20092130

作者贡献分布: 此课题由杜立阳指导; 由陈铭诗设计; 整体动物实验部分由陈铭诗、刘清芳、程晓磊及李鲜明共同操作完成; 数据检测及分析部分由陈铭诗完成; 论文撰写由陈铭诗完成。

通讯作者: 杜立阳, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院中医科. cmzyk@163.com

电话: 024-83282537

收稿日期: 2011-01-07 修回日期: 2011-03-01

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-04-28

Treatment with Compound Indigo Granules down-regulates NF- κ B P65 and TNF- α expression in ulcerative colitis in rats

Li-Yang Du, Ming-Shi Chen, Qing-Fang Liu, Xiao-Lei Cheng, Xian-Ming Li

Li-Yang Du, Ming-Shi Chen, Qing-Fang Liu, Xiao-Lei Cheng, Xian-Ming Li, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20092130

Correspondence to: Associate Professor Li-Yang Du, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmzyk@163.com

Received: 2011-01-07 Revised: 2011-03-01

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To determine the mechanism underlying the therapeutic effects of Compound Indigo Granules (CIG) against ulcerative colitis by investigating the effect of treatment with CIG on the expression of nuclear factor- κ B P65 (NF- κ B P65) and tumor necrosis factor (TNF)- α in the colon of rats with experimental ulcerative colitis.

METHODS: Ulcerative colitis was induced in rats with trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Rats were divided into control group, model group, salazosulfapyridine (SASP) group, low-, medium-, and high-dose CIG groups. Except the control group, the other groups were intragastrically

given normal saline, SASP, and different doses of CIG from day 3 after model induction for 10 days, respectively. On day 14, all rats were killed to take colon and serum samples for measuring colonic NF- κ B P65 expression by immunohistochemistry and serum TNF- α levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The levels of NF- κ B P65 protein expression in the colon and serum TNF- α were significantly higher in the model group than in the control group (0.138 ± 0.003 vs 0.276 ± 0.0081 ; 18.990 ± 3.964 vs 67.657 ± 3.580 , both $P < 0.05$) but were significantly lower in the high-dose CIG group than in the model group (0.217 ± 0.007 vs 0.276 ± 0.008 ; 27.783 ± 2.867 vs 67.657 ± 3.580 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with CIG significantly decreased the levels of NF- κ B P65 protein expression in the colon and serum TNF- α in rats with ulcerative colitis. CIG exerts therapeutic effects against ulcerative colitis possibly via mechanisms associated with the NF- κ B signaling pathway and down-regulation of TNF- α .

Key Words: Compound Indigo Granules; Ulcerative colitis; NF- κ B P65; Tumor necrosis factor- α

Du LY, Chen MS, Liu QF, Cheng XL, Li XM. Treatment with Compound Indigo Granules down-regulates NF- κ B P65 and TNF- α expression in ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1290-1294

摘要

目的: 探讨复方青黛颗粒治疗溃疡性结肠炎(UC)大鼠的相关机制。

方法: 用三硝基苯磺酸(TNBS)法制备大鼠UC模型, 分为空白对照组、模型对照组、柳氮磺吡啶(SASP)组、复方青黛颗粒低、中、高剂量组。造模后第3天开始灌胃给药, 共给药10 d, 实验第14天, 处死大鼠。取大鼠结肠组织及血清, 用免疫组织化学SP法检测NF- κ B P65蛋白表达, ELISA测定血清中肿瘤坏死因子

■同行评议者

李晓波, 教授, 上海交通大学药学院

α (TNF- α)的含量。

结果: 空白对照组与模型对照组比较, 结肠组织中NF- κ B P65蛋白表达及血清中TNF- α 表达明显增高(0.276 ± 0.0081 vs 0.138 ± 0.003 ; 67.657 ± 3.580 vs 18.990 ± 3.964 , 均 $P < 0.05$), 复方青黛颗粒高剂量组与模型对照组相比, 结肠组织中NF- κ B P65蛋白表达及血清中TNF- α 表达显著降低(0.217 ± 0.007 vs 0.276 ± 0.008 ; 27.783 ± 2.867 vs 67.657 ± 3.580 , 均 $P < 0.05$)。

结论: 复方青黛颗粒对TNBS诱导的UC大鼠的治疗作用可能与通过NF- κ B信号传导通路, 调节TNF- α 含量有关。

关键词: 复方青黛颗粒; 溃疡性结肠炎模型大鼠; NF- κ B P65; 肿瘤坏死因子 α

杜立阳, 陈铭诗, 刘清芳, 程晓磊, 李鲜明. 复方青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠NF- κ B P65、TNF- α 表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1290-1294
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1290.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的病因及发病机制目前尚不清楚, 免疫系统异常是造成炎症和组织损伤的内在因素, 并与遗传、环境、微生物等因素密切相关。UC的治疗目前仍以氨基水杨酸类和糖皮质激素为主。复方青黛颗粒是中国医科大学附属第一医院中医科用于治疗UC的协定处方, 经30多年临床应用疗效显著。研究表明促炎症反应细胞因子及其他炎症介质包括TNF- α 和细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)在炎症反应过程中起重要作用, 他们在肠黏膜中含量增加是UC发病的重要因素, 同时NF- κ B信号传导通路激活是慢性炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病机制之一^[1]。在UC模型大鼠肠组织中NF- κ B表达水平与TNF- α 、ICAM-1阳性表达呈正相关^[2]。本实验通过复方青黛颗粒治疗TNBS诱导的UC大鼠模型, 检测结肠组织NF- κ B P65蛋白的表达、血清中TNF- α 含量, 进一步探讨复方青黛颗粒治疗UC的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 酶标定量测定仪、连续加样枪(日本Nichiryo公司)。复方青黛颗粒(NIGC, 中国医科大学), 柳氮磺吡啶(SASP, 批号040106, 上海三维制药有限公司), TNBS(批号: P2297, 美国Sigma

公司), 大鼠TNF- α ELISA试剂盒(96T, 批号: 300333, 美国ADL公司), NF- κ B P65鼠多克隆抗体(Santa Cruz公司); SP试剂盒、DAB显色试剂盒: 均购自北京中杉生物公司。

1.2 方法

1.2.1 TNBS法制备UC大鼠模型: TNBS法大鼠UC模型的制备方法参考文献[3-5]。SD大鼠, δ , 体质量 $250 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$, 52只, 随机分为6组, 空白对照组, 模型对照组, 柳氮磺吡啶(0.5 g/kg , SASP组), 复方青黛颗粒低(0.6 g/kg)、中(0.9 g/kg)、高(1.2 g/kg)剂量组。灌胃药物剂量均按照大鼠与人之间药物剂量换算公式计算。各组动物于造模前禁食24 h, 以 0.9 g/kg 乌拉坦腹腔注射麻醉, 固定于平板上, 平板下部垫高使动物尾部与头部呈40度。将体积分数为5%的TNBS水溶液与500 mL/L乙醇以体积比1:1混匀。取一外径2.0 mm、长约12 cm的硅胶输液管(用石蜡油润滑), 插入大鼠肛门8 cm, 按剂量100 mg/kg缓慢灌注TNBS乙醇溶液, 1 min灌注完, 2 min后松开固定, 取其俯卧位自然苏醒。造模结束后第2天随机处死大鼠4只, 剖腹摘取直肠和结肠, 清洗后肉眼观察结肠充血水肿情况, 并取8 cm肠段(甲醛固定)做病理检查及组织切片确定造模成功。造模后第3天开始各组动物灌胃给药, 连续给药10 d。空白对照组和模型对照组动物按10 mL/kg体质量胃内给予蒸馏水, 每日记录动物体质量、体征及粪便状况。

1.2.2 标本处理: 连续给药10 d后处死大鼠, 立即沿腹中线剪开腹腔, 腹主动脉取血, 2 500 r/min离心10 min分离血清, 置于 -80°C 冰箱保存以备检测血清TNF- α 含量。分离结肠, 沿肠系膜剪开肠腔取病变结肠, 冷生理盐水冲洗干净, 肉眼进行大体形态观察, 拍摄大病理数码相片。取病变结肠组织 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ 放入EP管中, 置于 -80°C 冰箱保存备用。剩余部分用4%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, $3 \mu\text{m}$ 连续切片, HE染色, 镜下评价炎症和溃疡情况。

1.2.3 血清TNF- α 含量测定: 根据TNF- α ELISA试剂盒方法检测血清样本, 后用酶标仪测定450 nm处吸光度值, 作标准曲线, 回归计算血清中TNF- α 含量。

1.2.4 NF- κ B P65蛋白表达测定: 根据免疫组织化学(SP)法, 对NF- κ B P65进行蛋白表达测定。DAB显色后, 以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。利用Image-pro plus 4.5显微图像分析系统对染色阳性物质进行吸光度测定。以高倍镜($\times 400$)在每

■ 相关报道

有研究显示, 作为可诱发的转录调节因子, NF- κ B结合位点可接受免疫刺激, 如TNF- α 、IL-1、LPS或T淋巴细胞激活。

■创新盘点

本文通过研究TNBS诱导的溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- κ B P65及血清TNF- α 表达,来阐明复方青黛颗粒治疗溃疡性结肠炎的作用机制,并进行药物治疗疗效比较。

张切片上随机选取5个视野,测定阳性部位总吸光度值和总面积值,计算二者比值即阳性表达部位的平均光密度值,该值越大,表明蛋白含量越高。

统计学处理 采用SPSS13.0随机单位组设计资料的方差分析S-N-K统计方法分析数据,用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。

2 结果

2.1 对UC模型大鼠血清中TNF- α 含量的影响 空白对照组、模型对照组、SASP组、复方青黛颗粒低、中、高剂量组大鼠血清中TNF- α 含量分别为: 18.990 ± 3.964 、 67.657 ± 3.580 、 23.454 ± 3.500 、 42.053 ± 3.413 、 34.846 ± 4.091 、 27.783 ± 2.867 。模型对照组大鼠血清TNF- α 的含量与正常对照组比较显著升高($P < 0.05$)。经过复方青黛颗粒治疗后,高剂量组TNF- α 的含量显著低于模型对照组,具有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 对UC模型大鼠结肠组织中NF- κ B P65蛋白表达的影响 NF- κ B P65各组肠组织黏膜层可见中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞及嗜酸性粒细胞浸润,细胞质出现棕黄色颗粒为阳性(图1)。空白对照组、模型对照组、SASP组、复方青黛颗粒低、中、高剂量组大鼠结肠组织NF- κ B P65蛋白定量分析分别为: 0.138 ± 0.003 、 0.276 ± 0.008 、 0.223 ± 0.005 、 0.269 ± 0.008 、 0.251 ± 0.008 、 0.217 ± 0.007 。模型对照组大鼠结肠组织NF- κ B P65蛋白表达与正常对照组比较显著升高($P < 0.05$)。经复方青黛颗粒治疗后,高剂量组大鼠结肠组织NF- κ B P65蛋白表达减少,与模型对照组相比较具有统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨论

UC属祖国医学“泄泻”、“久痢”、“休息痢”、“肠癖”、“肠风”等范畴。现代医学认为: UC是一种主要分布于结肠和直肠黏膜或黏膜下层的、边界不清楚的炎性反应,属于IBD的一种。临床表现为腹泻、黏液脓血便、腹痛。病情轻重不等,多呈反复发作的慢性病程。可伴有多种肠外表现,包括外周性关节炎、结节性红斑、坏疽性脓皮病、巩膜外层炎等。本病可发生在任何年龄,多见于20-40岁,亦可见于儿童或老年。

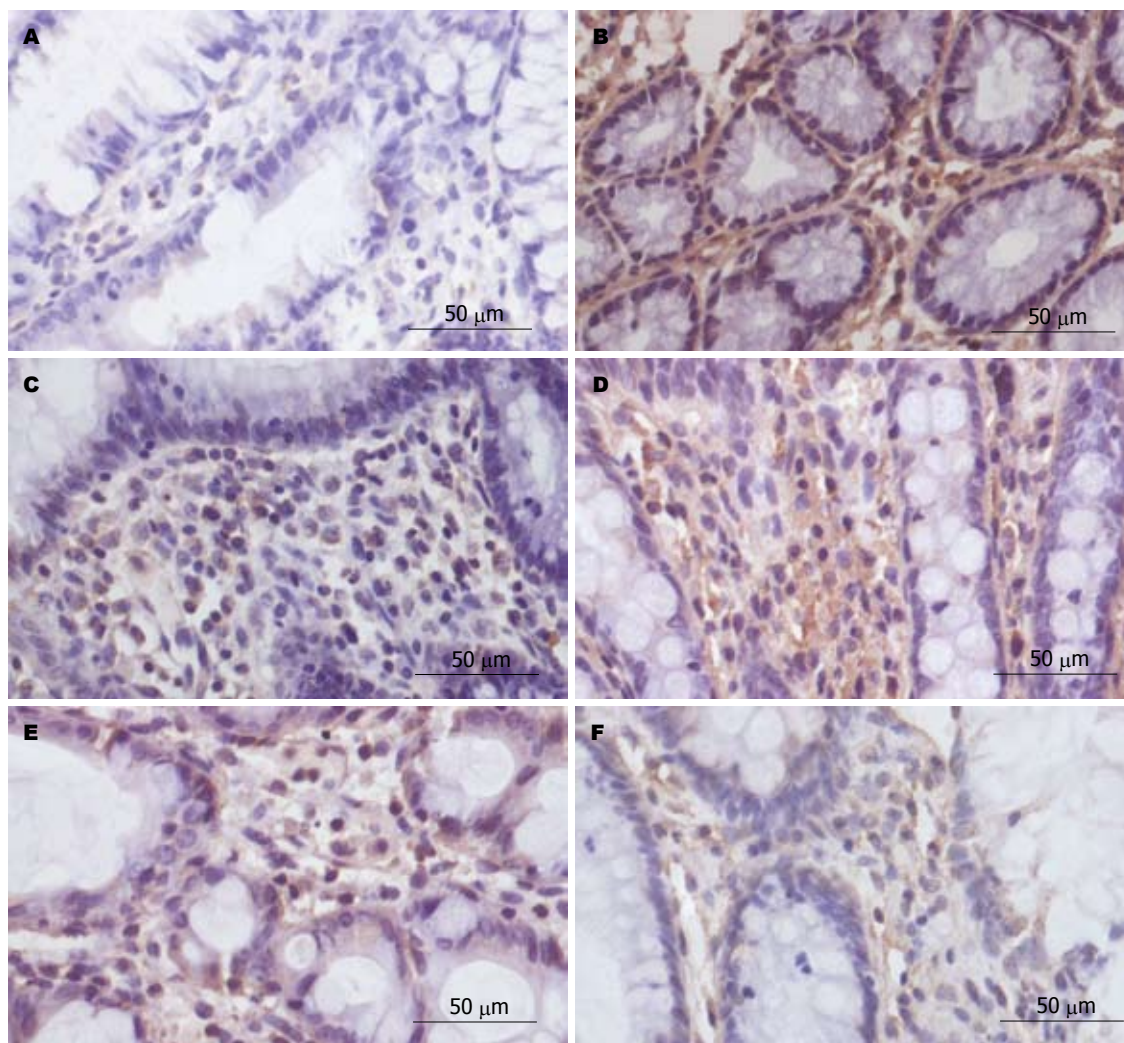
复方青黛颗粒由青黛、黄柏、儿茶、枯矾、珍珠等组成。组方中所含有效化学成分具有加强机体吞噬细胞的吞噬能力,抗病原微生物,

抑制肠黏膜分泌,抑制肠蠕动,促进盲肠逆蠕动,能和蛋白化合合成难溶于水的蛋白化合物而形成沉淀,用于局部出血,促进创口愈合和抑制实验性溃疡的作用^[6]。前期研究结果表明,复方青黛颗粒能显著减轻异种异体结肠致敏所致大鼠实验性UC模型的症状^[7],减少结肠组织中自由基的形成^[8],并有镇痛抗炎^[9],抑制肠蠕动的作用^[10],能下调CD54的过度表达和调节IL-1 β 、IL-4、MUC2、iNOS水平^[11]。

TNF- α 主要由活化的单核巨噬细胞所产生,是一种具有广泛生物活性的细胞因子,可使白细胞在炎症局部聚集,刺激单核细胞、血管内皮细胞等产生细胞因子,并诱导细胞因子合成及发生级联反应,最终导致组织的损伤,在UC中被公认为是一种促炎细胞因子。在UC活动期,TNF- α 的水平在血浆及粪便中升高,在肠道中能介导肠黏膜损伤作用^[12]。本实验中UC大鼠血清中存在TNF- α 水平异常增高,增高的TNF- α 与炎症细胞相互作用,加重局部肠黏膜的炎症损伤。经过复方青黛颗粒治疗,抑制TNF- α 的活化,减少TNF- α 与炎症细胞相互作用,减轻局部肠黏膜的炎症损伤,从而促进肠黏膜修复与溃疡愈合。

NF- κ B广泛存在于各种组织中,正常情况下存在于细胞质内,是一种具有多向转录调节作用的蛋白质,参与许多炎症性疾病的发病机制。哺乳动物的NF- κ B家族包括5种成员: NF- κ B1 (P105/P50)、NF- κ B2 (P100/P52、P65RelA)、C-rel和RelB。研究显示: NF- κ B可上调肠黏膜中致炎细胞因子IL-1、TNF- α 的表达,加重肠黏膜的炎症,引起上皮细胞的凋亡,且NF- κ B活化后可以增强TNF- α 和IL-1 β 的基因转录,使TNF- α 和IL-1 β 产生和释放增多^[13,14]。在鼠UC实验中发现,肠黏膜组织中活化的NF- κ B及促炎因子TNF- α 表达上调,而NF- κ B抑制物水平下降。肠道炎性细胞核提取物中NF- κ B P65水平明显升高^[15]。实验数据分析表明: UC模型大鼠结肠组织NF- κ B P65的含量明显高于空白对照组大鼠的含量,并且UC模型大鼠经复方青黛颗粒治疗后,大鼠结肠组织NF- κ B P65的含量显著降低,由此可以得出复方青黛颗粒治疗UC可能通过NF- κ B信号传导通路。

TNBS是一种半抗原物质,与大分子组织蛋白结合后成为一种抗原物质,引起机体免疫反应,诱导肠炎发生。该方法成熟,易操作,是较理想的造模途径^[16]。本实验通过TNBS制备UC大鼠模型,经过复方青黛颗粒治疗, NF- κ B P65及



■应用要点

复方青黛颗粒在治疗UC中,可能与通过NF- κ B信号传导通路,抑制TNF- α 的活化,减少TNF- α 与炎症细胞相互作用有关。

图1 各组大鼠结肠组织NF- κ B P65表达(SP \times 400). A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: SASP组; D: 青黛颗粒低剂量组; E: 青黛颗粒中剂量组; F: 青黛颗粒高剂量组。

TNF- α 的表达明显减少。从而可以得出复方青黛颗粒在治疗UC中可能通过NF- κ B信号传导通路,抑制TNF- α 的活化,减少TNF- α 与炎症细胞相互作用,降低各种炎症细胞的渗出及炎症细胞因子的含量,减轻局部肠黏膜的炎症损伤,从而促进肠黏膜修复与溃疡愈合。

4 参考文献

- 1 Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu SQ. Expression and significance of nuclear factor kappaB p65 in colon tissues of rats with TNBS-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1759-1763
- 2 李军华, 于皆平, 何小飞, 徐细明. 核因子- κ B在大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 214-218
- 3 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- 4 Shorter RG, Huizenga KA, Spencer RJ. A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *Am J Dig Dis* 1972; 17: 1024-1032
- 5 te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 995-999
- 6 颜正华. 临床实用中医学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 153-154
- 7 杜立阳, 宗士群, 刘悦, 李东安, 赵金明, 张艳玲. 复方青黛颗粒对大鼠溃疡性结肠炎模型的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2002; 10: 135-137
- 8 杜立阳, 邹莉波, 宗士群, 刘悦. 青黛颗粒抗氧化作用的实验研究. *中国中西医结合杂志* 2003; 11: 144-145
- 9 杜立阳, 刘悦, 宗士群, 李东安, 赵金明, 张艳玲. 青黛颗粒抗炎、镇痛作用的实验研究. *中国医科大学学报* 2003; 32: 456-457
- 10 杜立阳, 宗士群, 刘悦, 刘艳, 李东安, 赵金明, 张艳玲. 青黛颗粒对小鼠小肠推进运动的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2004; 12: 337-38
- 11 杜立阳, 刘清芳, 程晓磊, 陈铭诗, 李鲜明, 仇靖. 青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜MUC2和iNOS基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 937-941
- 12 林平, 伍杨, 黄华, 梅林. 细胞因子与溃疡性结肠炎. *湖北民族学院学报(医学版)* 2003; 20: 28-33
- 13 Woodford-Richens K, Bevan S, Churchman M, Dowling B, Jones D, Norbury CG, Hodgson SV, Desai D, Neale K, Phillips RK, Young J, Leggett B, Dunlop M, Rozen P, Eng C, Markie D, Rodriguez-

■同行评价

本文具有一定的理论价值和科学意义,对于阐明UC发病机制和复方青黛颗粒的作用机制具有一定贡献。

- Bigas MA, Sheridan E, Iwama T, Eccles D, Smith GT, Kim JC, Kim KM, Sampson JR, Evans G, Tejpar S, Bodmer WF, Tomlinson IP, Houlston RS. Analysis of genetic and phenotypic heterogeneity in juvenile polyposis. *Gut* 2000; 46: 656-660
- 14 黄晓丽, 谢冬梅, 甘华田. 肿瘤坏死因子 α 在溃疡性结肠炎中的作用. 华西医学 2006; 21: 399-400
- 15 Howe JR, Shellnut J, Wagner B, Ringold JC, Sayed MG, Ahmed AF, Lynch PM, Amos CI, Sistonen P, Aaltonen LA. Common deletion of SMAD4 in juvenile polyposis is a mutational hotspot. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1357-1362
- 16 姚惠芬, 陈务华, 周毅. 溃疡性结肠炎动物模型研究概况. 天津药学 2006; 18: 72-74

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *L*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。