

雷公藤多苷对溃疡性结肠炎大鼠炎症因子及结肠

组织丝裂原 p38 活化蛋白激酶和核因子 - κ Bp65 蛋白表达的影响Effect of glucosidorum tripterygii tororum on the expression of inflammatory factor and p38MAPK , nuclear factor - κ Bp65 protein in ulcerative colitis rats

杨先礼, 徐明婧

(贵州省人民医院 中医科, 贵阳 550002)

YANG Xian - li , XU Ming - jing

(Department of Traditional Chinese Medicine , Guizhou Provincial People ' s Hospital of Traditional Chinese Medicine , Guiyang 550002 , China)

摘要:目的 研究雷公藤多苷对溃疡性结肠炎大鼠炎症因子及结肠组织丝裂原 p38 活化蛋白激酶(p38MAPK) 和核因子 - κ Bp65(NF - κ Bp65) 蛋白表达的影响。方法 从 32 只 Wistar 大鼠中随机选取 8 只为正常组不做任何处理 24 只构建溃疡性结肠炎大鼠模型 死亡 2 只 将剩余 22 只模型大鼠随机分为模型组($n=7$)、实验组($n=8$) 和阳性对照组($n=7$)。正常组和模型组均灌胃生理盐水 10 mL \cdot kg⁻¹, 试验组灌胃雷公藤多苷 20 mg \cdot kg⁻¹ 阳性对照组灌胃柳氮磺吡啶片 0.5 mg \cdot kg⁻¹ 连续灌服 14 d。用酶联免疫吸附实验测定各组大鼠血清炎症因子水平 用苏木精 - 伊红染色法观察各组大鼠结肠组织病理变化 用蛋白质免疫印迹法检测结肠组织 p38MAPK、NF - κ Bp65 蛋白的表达。结果 模型组大鼠血清 IL - 4 水平低于正常组, 实验组和阳性对照组 IL - 4 水平高于模型组($P < 0.01$); 模型组大鼠血清 IL - 6 水平高于正常组、实验组和阳性对照组($P < 0.01$); 模型组、实验组和阳性对照组大鼠血清 IL - 1 β 水平高于正常对照组, 实验组和阳性对照组 IL - 1 β 水平低于模型组($P < 0.01$)。模型组、实验组和阳性对照组结肠组织损伤评分分别为(4.56 \pm 0.88), (1.65 \pm 0.53), (1.50 \pm 0.54) 分, 明显高于对照组的(0.23 \pm 0.32) 分($P < 0.01$); 与模型组比较, 实验组和阳性对照组结肠组织损伤评分均降低(均 $P < 0.01$)。模型组 p38MAPK 和 NF - κ Bp65 蛋白相对表达量分别为 1.62 \pm 2.39, 1.53 \pm 3.21, 明显高于正常对照组的 0.74 \pm 0.11, 0.63 \pm 0.09; 实验组和阳性对照组 p38MAPK 蛋白相对表达量分别为 0.93 \pm 0.16, 0.78 \pm 0.19, NF - κ Bp65 蛋白相对表达量分别为 0.81 \pm 0.23, 0.72 \pm 0.16, 均显著低于模型组(均 $P < 0.01$)。结论 雷公藤多苷可有效降低溃疡性结肠炎大鼠血清炎症因子水平, 改善结肠黏膜组织形态, 其分子实质可能与降低 p38MAPK 及 NF - κ Bp65 蛋白表达量, 调控其所介导的炎症反应通路有关。

关键词: 雷公藤多苷; 溃疡性结肠炎; 炎症因子; p38 活化蛋白激酶; 核因子 - κ Bp65

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.08.017

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2018)08-0975-04

Abstract: Objective To observe the effect of glucosidorum tripterygii tororum on the expression of inflammatory factor and p38 mitogen - activated protein kinases (p38MAPK) , nuclear factor - κ B (NF - κ B) p65 protein in ulcerative colitis rats. **Methods** Eight Wistar rats were randomly selected as normal group , without any treatment , 24 rats were modeled on ulcerative colitis rats , 2 rats dead , the remaining 22 rats were randomly divided into model group ($n=7$) , test group ($n=8$) and positive control group ($n=7$) . The normal group and model group were

收稿日期: 2017 - 12 - 21

修回日期: 2018 - 01 - 25

作者简介: 杨先礼(1964 -) , 男, 副主任医师, 主要从事疾病的中医药治疗工作

通信作者: 杨先礼

MP: 18085350928

E - mail: 2585879493@qq.com

gavaged with 0.9% NaCl 10 mL · kg⁻¹, test group was gavaged with glucosidorum tripterygii tororum 20 mg · kg⁻¹, positive control group was gavaged with sulfasalazine tablets 0.5 mg · kg⁻¹, all rats were continuously gavaged for 14 d. The levels of serum inflammatory cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, the histopathological changes of colon were observed by hematoxylin-eosin staining, the expression of p38MAPK and NF-κBp65 protein were detected by Western blotting. **Results** The serum IL-4 level in model group was significantly lower than that in normal group, IL-4 levels in test and positive control group were higher than those in model group ($P < 0.01$). The level of serum IL-6 in model group was higher than those in normal group, test group and positive control group ($P < 0.01$). The levels of serum IL-1β in model group, test group and positive control group were higher than that in normal group ($P < 0.01$), the levels of IL-1β in test group and positive control group were lower than that in model group ($P < 0.01$). The colon tissue injury score of model group, test group and positive control group were 4.56 ± 0.88, 1.65 ± 0.53, 1.50 ± 0.54, higher than that in normal group, which was 0.23 ± 0.32 ($P < 0.01$), compared with model group, the scores of colonic tissue injury in test group and positive control group decreased ($P < 0.01$). The relative expression of p38MAPK and NF-κBp65 in model group were 1.62 ± 2.39, 1.53 ± 3.21, higher than those in normal group, which were 0.74 ± 0.11, 0.63 ± 0.09. The relative expression levels of p38MAPK protein in test group and positive control group were 0.93 ± 0.16, 0.78 ± 0.19, the relative expression levels of NF-κBp65 protein were 0.81 ± 0.23, 0.72 ± 0.16, lower than model group (all $P < 0.01$). **Conclusion** Glucosidorum tripterygii tororum can effectively reduce the levels of serum inflammatory cytokines in ulcerative colitis rats and improve the morphology of colonic mucosa. The molecular substance may be related to the decrease of p38MAPK and NF-κBp65 protein expression and the regulation of inflammatory pathway.

Key words: glucosidorum tripterygii tororum; ulcerative colitis; inflammatory factor; p38 mitogen-activated protein kinase; nuclear factor-κBp65

溃疡性结肠炎是临床常见慢性非特异性肠炎,与感染、免疫功能水平及患者精神因素具有一定的相关性。细胞因子失衡是其发病的关键环节。雷公藤多苷具有明显的抑制细胞炎性因子、降低结肠组织氧化应激水平的作用。研究证实^[1-2],丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及核因子-κB(NF-κB)所介导的炎症反应通路在溃疡性结肠炎发生发展中起重要作用,其中p38MAPK和NF-κBp65是该通路上的主要位点蛋白。本研究旨在探讨雷公藤多苷对溃疡性结肠炎大鼠的炎性因子及结肠组织丝裂原p38MAPK和NF-κBp65蛋白表达的影响。

材料与方 法

1 材料

动物 无特定病原体(SPF)级Wistar大鼠,4~8周龄,体重140~180g,雌雄各半,购自广东省医学实验动物研究中心。动物许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

药品与试剂 雷公藤多苷,规格:每片100mg,批号:130513,购自江苏美通制药有限公司;柳氮磺吡啶片,规格:每片0.2g,批号:20151210,购自上海信宜

天平药业有限公司。2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),购自美国Sigma公司;10%水合氯醛和多聚甲醛,购自上海歌凡生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色液,购自武汉谷歌生物科技有限公司;白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1β(IL-1β)酶联免疫吸附实验(ELISA)检测试剂盒,均购自上海源叶生物科技有限公司;兔抗鼠p38MAPK、NF-κBp65一抗,购自美国CST公司;辣根过氧化物酶标记二抗山羊抗兔,购自北京中杉生物技术有限公司。

仪器 DNM-9602G自动酶标仪,购自美国Biotek公司;CKX-31荧光倒置相差显微镜,购自日本Olympus公司;UniCel Dx C 600 Synchron自动生化仪,购自美国Beckman公司。

2 实验方法

2.1 建模、分组与给药^[3]

大鼠室温20~25℃,湿度55%~60%饲养约4周,确保其完全适应新环境后再进行后续实验研究。从32只Wistar大鼠中随机选取8只不做任何处理为正常组,其余24只构建溃疡性结肠炎大鼠模型,用综合因素结合TNBS/乙醇灌肠法建模,期间因灌胃不当造成2只大鼠死亡,建模成功后将22只模型大鼠随

机分为模型组($n=7$)、实验组($n=8$)和阳性对照组($n=7$)。正常组正常喂养,肛门给予生理盐水灌肠,每只0.8 mL,生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃;模型组给予生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃;实验组给予雷公藤多苷 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,阳性对照组给予柳氮磺吡啶片 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,连续灌服14 d。

2.2 标本采集^[4]

实验结束前1 d所有大鼠禁食禁水24 h,以10%水合氯醛腹腔注射麻醉,由腹主动脉采血,离心分离上清,并分装于无酶冻存管 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存;开腹,从肛门向上纵向剪开结肠组织,取肛门上约8 cm左右或病变明显部位的组织,生理盐水反复冲洗后置于液氮和10%多聚甲醛溶液。

2.3 用ELISA法测定大鼠血清炎症因子水平^[5]

用ELISA法检测4组大鼠血清IL-4、IL-6、IL-1 β 等炎症因子水平,严格按照说明书要求进行操作。

2.4 HE染色法观察结肠组织病理变化^[6]

结肠组织经石蜡包埋后制成切片,常规HE染色,于光学显微镜下观察并记录结肠组织的病理变化,并参照相关文献,进行病变部位的评分,总分0~5分,0分为结肠部位没有损伤,5分为重度糜烂、充血水肿严重。

2.5 用Western blot法检测p38MAPK、NF- κ Bp65相关蛋白的表达^[7]

提取结肠组织中总蛋白,并进行定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)电泳后转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,常规封闭2 h,分别加入1:1000稀释的兔抗鼠p38MAPK、NF- κ Bp65多克隆抗体 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜后,分别加入稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG),室温脱脂奶粉封闭2 h;化学发光底物发光并曝光后,用Image J图像分析软件进行扫描分析。

3 统计学处理

用SPSS 18.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验,多组间计量资料比较用重复测量方差分析。

结 果

1 大鼠血清炎症因子指标水平比较

结果显示,模型组大鼠血清IL-4水平明显低于正常组,而实验组和阳性对照组IL-4水平明显高于模型组($P<0.01$);模型组大鼠血清IL-6水平明显高于正常组、实验组和阳性对照组($P<0.01$);模型组、实验组和阳性对照组大鼠血清IL-1 β 水平明显高于正常组,而实验组和阳性对照组IL-1 β 水平明显低于模型组($P<0.01$);实验组和阳性对照组间血清炎症因子指标水平差异均无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2 大鼠结肠组织病理变化及评分

大鼠结肠组织经HE染色后,光镜下可见,正常组大鼠结肠黏膜腺体形态正常,未见溃疡、纤维组织增生,仅少许炎性细胞浸润;模型组可见结肠黏膜下组织结构被破坏,模糊不清,伴有肉芽组织增生;实验组溃疡病灶周围已有新生黏膜上皮被覆,黏膜肌层出现纤维性修复,偶见炎性细胞浸润;阳性对照组病变结肠组织小灶状纤维组织增生,病变部位被新黏膜细胞覆盖,黏膜下各层伴纤维性修复,少量炎性细胞,见图1。

模型组、实验组和阳性对照组结肠组织损伤评分分别为 (4.56 ± 0.88) 、 (1.65 ± 0.53) 、 (1.50 ± 0.54) 分,明显高于正常对照组的 (0.23 ± 0.32) 分($P<0.01$);与模型组比较,实验组和阳性对照组结肠组织损伤评分明显降低($P<0.01$);实验组和阳性对照组间结肠组织损伤评分差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 结肠组织中p38MAPK、NF- κ Bp65蛋白表达比较

模型组p38MAPK、NF- κ Bp65蛋白相对表达量分别为 1.62 ± 2.39 、 1.53 ± 3.21 ,明显高于对照组的 0.74 ± 0.11 、 0.63 ± 0.09 ;实验组和阳性对照组p38MAPK蛋白相对表达量分别为 0.93 ± 0.16 、 0.78 ± 0.19 ,NF- κ Bp65蛋白相对表达量分别为 0.81 ± 0.23 、 0.72 ± 0.16 ,均低于模型组,见图2。

表1 各组大鼠血清炎症因子指标水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of serum inflammatory factors of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IL-4 ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-6 ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-1 β ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
Normal	8	102.16 ± 30.12	27.49 ± 2.69	62.45 ± 11.28
Model	7	$59.48\pm 12.35^{**}$	$40.12\pm 4.36^{**}$	$1235.15\pm 126.25^{**}$
Positive control	7	$112.02\pm 30.24^{##}$	$29.57\pm 2.62^{##}$	$755.12\pm 82.14^{**##}$
Test	8	$98.15\pm 28.14^{##}$	$29.15\pm 2.58^{##}$	$836.21\pm 86.47^{**##}$

Test group: Glucosidorum tripterygii tororum $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; Positive control: Sulfasalazine tablets $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; Normal group and model group: 0.9% NaCl; IL-4: Interleukin-4; IL-6: Interleukin-6; IL-1 β : Interleukin-1 β ; Compared with normal group, $^{**}P<0.01$; Compared with model group, $^{##}P<0.01$

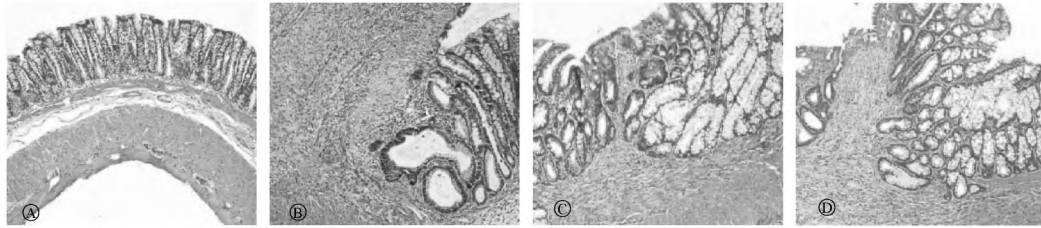


图1 大鼠结肠组织苏木精-伊红(HE)染色结果

Figure 1 Results of hematoxylin-eosin (HE) staining results in colon tissue of rats

A: Normal group; B: Model group; C: Test group; D: Positive control group

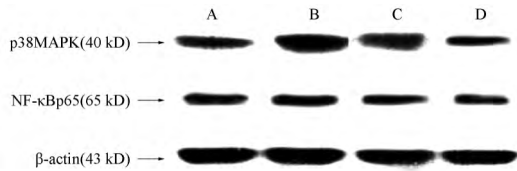


图2 结肠组织中丝裂原 p38 活化蛋白激酶和核因子-κBp65 蛋白表达情况

Figure 2 Expression of p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK), nuclear factor p65 (NF-κBp65) in colon tissue

A: Normal group; B: Model group; C: Test group; D: Positive control group

讨 论

溃疡性结肠炎通常以结肠黏膜组织溃疡、糜烂及细胞非典型增生为主要临床表现,然而部分患者因临床症状的不典型性,致使失去最佳治疗时机,且延误治疗也存在癌变的可能性。研究发现^[8] 溃疡性结肠炎发病过程中 IL-6、IL-8、IL-1β 等肠促炎细胞因子过度表达,致使肠道组织炎症反应加剧,组织损伤;IL-4 则具有抑制炎症的作用,并可稳定肠道黏膜微环境。

炎症反应过程均受 NF-κB、MAPK 等通路的调控,溃疡性结肠炎大鼠结肠中 NF-κBp65 存在过度表达现象,且 NF-κBp65 在结肠黏膜中处的高表达参与了溃疡性结肠炎的进展,其水平高低可反映疾病严重程度。p38MAPK 可通过调节 IL-10、TNF-α、IL-1β 等细胞因子的表达在溃疡性结肠炎的发生发展中发挥重要作用,其在溃疡性结肠炎结肠组织中的表达也有明显增加和过度激活现象^[9-12]。本研究结果表明,雷公藤多苷可有效改善结肠黏膜组织形态和评分,可能与降低 p38MAPK 及 NF-κBp65 蛋白表达量,调控其所介导的炎症反应通路有关。

参考文献:

- [1] DOCENA G, ROVEDATTI L, KRUIDENIER L, *et al.* Down-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase activation and proinflammatory cytokine production by mitogen-activated protein kinase inhibitors in inflammatory bowel disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 162(1): 108-115.
- [2] KE X, ZHOU F, GAO Y, *et al.* Qing Hua Chang Yin exerts therapeutic effects against ulcerative colitis through the inhibition of the TLR4/NF-κB pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 926.
- [3] MORRIS G P, BECK P L, HERRIDGE M S, *et al.* Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795.
- [4] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 120.
- [5] 徐鑫, 孟柠, 俞毅君, 等. 大黄与甘草合用对肠功能衰竭大鼠炎症因子的影响研究 [J]. *中国全科医学*, 2016, 19(15): 1824-1827.
- [6] SANTEN S, MIHAESCU A, LASCHKE M W, *et al.* p38 MAPK regulates ischemia-reperfusion-induced recruitment of leukocytes in the colon [J]. *Surgery*, 2009, 145(3): 303.
- [7] GUPTA J, IGEA A, PAPAIOANNOU M, *et al.* Pharmacological inhibition of p38 MAPK reduces tumor growth in patient-derived xenografts from colon tumors [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(11): 8539-8551.
- [8] 张乐乐, 耿雷. 温中健脾法治疗慢性消化性溃疡及慢性非特异性溃疡性结肠炎临床研究 [J]. *世界中医药*, 2015, 10(3): 342-344.
- [9] 钦丹萍, 张绍珠, 周毅骏, 等. 雷公藤多苷对三硝基苯磺酸/乙醇溃疡性结肠炎大鼠炎症反应的作用 [J]. *中华消化杂志*, 2016, 36(9): 626-629.
- [10] 刘梓峰, 郭珍, 李燕舞, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠外周血 Treg/Th17 平衡的干预作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(1): 1-5.
- [11] 马建华, 郑绘霞, 赵玉泽, 等. 肠必清栓对 UC 模型大鼠结肠黏膜内 COX-2/NF-κB 及 TGF-β1 的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(8): 1682-1685.
- [12] 李军华, 周薇. P38MAPK 抑制剂对溃疡性结肠炎大鼠外周血淋巴细胞凋亡及相关调控蛋白的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(5): 668-673.

(本文编辑 王超群)