

- adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Biochemical pharmacology*, 2005, 70(8): 1192-1199.
- [15] Fotis L, Agogiannis G, Vlachos IS, et al. Intercellular adhesion molecule(ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model[J]. *In vivo*(Athens, Greece), 2012, 26 (2): 243-250.
- [16] Denys A, Clavel G, Lemeiter D, et al. Aortic VCAM-1: an early marker of vascular inflammation in collagen-induced arthritis [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2016, 20(5): 855-863.
- [17] Jiang CY, Yang KM, Yang L, et al. A ¹H NMR based metabolomics approach to progression of coronary atherosclerosis in a hamster model[J]. *Acta pharmaceutica Sinica*(药学报), 2013, 48 (4): 495-502.
- [18] 吴天敏, 杜建. 中医药抗动脉粥样硬化的研究概况[J]. *福建中医学院学报*, 2006, 16(3): 67-69.

(编辑: 修春)

溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠肠道 Treg 相关因子的调控作用

甘丽萍, 王 凤, 龙 宇, 李燕舞, 巫燕莉, 杜 群(广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察溃疡性结肠炎(UC)大鼠模型结肠黏膜调节性 T 细胞(Treg)相关因子白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 10(IL-10)表达, 叉头样转录因子 p3(Foxp3)、信号转导子与激活子 5(STAT5)蛋白原位表达以及基因表达的变化, 以及溃结灵(KD)对其的调控作用, 探讨溃结灵防治 UC 的作用机理。**方法** 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法复制 UC 大鼠模型并进行中药复方溃结灵药物干预治疗。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测结肠黏膜 IL-2、IL-10 的表达, 免疫组化方法检测结肠黏膜 Foxp3、STAT5 蛋白原位表达, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)方法检测 Foxp3、STAT5 基因表达。**结果** 模型组结肠黏膜 IL-2、IL-10 表达量均低于正常组($P < 0.01$, $P < 0.05$), 溃结灵高剂量组及阳性药物组黏膜 IL-2 表达量高于模型组($P < 0.01$), 溃结灵高、中剂量组及阳性药物组黏膜 IL-10 表达量均高于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 免疫组化检测模型组结肠黏膜 Foxp3、STAT5 的原位蛋白表达低于正常组($P < 0.01$), 溃结灵高、中、低剂量组及阳性药物组结肠黏膜 Foxp3、STAT5 的原位蛋白表达均高于模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 模型组结肠黏膜 Foxp3、STAT5 mRNA 表达量低于正常组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 溃结灵高、中剂量组及阳性药物组 Foxp3 mRNA 表达高于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 溃结灵高剂量组及阳性药物组 STAT5 mRNA 高于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 溃结灵对 UC 大鼠模型结肠黏膜 IL-2、IL-10 含量以及 Foxp3、STAT5 原位蛋白及基因表达的上调作用, 可能是其促进 Treg 细胞的分化, 发挥治疗 UC 作用的机制之一。

关键词: 溃结灵; 溃疡性结肠炎; IL-2; IL-10; Foxp3; STAT5; 调节性 T 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)01-0013-0

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.003

Effects of Kuijieling on Treg related factors in Experimental Ulcerative Colitis Rats

Gan LiPing, Wang Feng, Long Yu, Li YanWu, Du Qun (Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Kuijieling Decoction (KD) on Treg regulated factors including Interleukin-2, Interleukin-10, Foxp3 and STAT5 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis (UC), and explore

收稿日期: 2016-09-01

作者简介: 甘丽萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合基础。Email: 947114556@qq.com。通信作者: 杜群, 研究员, 研究方向: 中医药治疗炎症性肠病的机制研究。Email: duqun@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(81373798); 广州中医药大学“中医药防治脾胃病、脑病创新研究团队项目(2016KYTD07)。

its possible mechanism. Methods Trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS) was used to establish UC rat model. After treatment with different dosages of KD, immunohistochemical technique was used to detect the expressions of Foxp3 and STAT5 in colonic mucosa. Real time-PCR was used to measure mRNA expression of Foxp3 and STAT5, and the content of IL-2 and IL-10 was determined using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) kit. Results The content of IL-2 and IL-10 in colonic mucosa of model group were both lower than that of normal group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the expression of IL-2 in high dosage KD groups and positive drug salazosulfapyridine (SASP) group were both significantly higher than that in model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The IL-10 in colonic mucosa in high, middle groups and SASP group were significantly higher than that in model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The situ protein expression for Foxp3 and STAT5 in model group was notably lower than that in normal group ($P < 0.01$), and the situ protein of Foxp3 and STAT5 in high, middle, low dosage KD groups and SASP group were both obviously higher than that in model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The expression of the gene of Foxp3 and STAT5 in model group was notably lower than that in normal group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the gene of Foxp3 in high, middle dosage KD groups and SASP group were both obviously higher than that in model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The gene of STAT5 in high dosage KD groups and SASP group were both obviously higher than that in model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion The relative expressions of IL-2, IL-10, the situ protein and gene of Foxp3 and STAT5 of UC model rats induced by TNBS could be up-regulated after the treatment with KD. The mechanism of cure the UC might be that KD could improve the content of IL-2, IL-10 and Foxp3 and STAT5, and reduce inflammatory reaction through promoting the differentiation of Treg cells.

Keywords: Kujieling (KD); UC; IL-2; IL-10; Foxp3; STAT5; Treg

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种由异常免疫介导,多重病理因素综合作用的慢性非特异性肠道炎症^[1]。调节性T细胞(Regulatory T cell, Treg)是一类具有炎症抑制作用的T细胞,Treg缺乏和多种自身免疫性炎症疾病相关,在UC等炎症性疾病的发生发展中有重要作用^[2]。溃结灵是本所在多年临床实践的基础上总结出的,对溃疡性结肠炎疗效确切的中药复方^[3],药物由救必应、水蛭、白芍、白术、炙甘草组成,有清热健脾活血之效。前期研究^[4-5]表明,溃结灵水煎剂对实验性UC大鼠模型有较好的治疗效果,用药后溃疡数量和面积均减小,且能够提高外周血CD4⁺Foxp3⁺Treg细胞比例并降低CD4⁺IL-17A⁺辅助性T细胞(CD4⁺IL-17A⁺ Helper T cell, CD4⁺IL-17A⁺Th17)比例,恢复机体Treg/Th17平衡^[6]。本研究主要从Treg分化相关因子方面入手,观察溃结灵对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导大鼠UC模型的结肠黏膜中白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素10(IL-10)含量以及叉头样转录因子p3(Foxp3)、信号转导子与激活子5(STAT5)原位蛋白表达和基因表达的影响,分析溃结灵对UC疗效的分子机制,为中医药治疗UC的进一步研究打下基础。

1 材料与方法^[7]

1.1 动物 SD大鼠,雄性,SPF级,体质量(190±10)g,广东省医学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2013-0002,动物质量合格证号:NO.44200300007144。

1.2 药物 溃结灵组方药材均购自采芝林连锁药店:救必应为冬青科(*Aquifoliaceae*)冬青属(*Ilex L*)植物铁冬(*Ulex rotunda Thunb*)的干燥树皮;白术为菊科(*Asteraceae*)苍术属(*Atractylodes*)植物白术(*Atractylodes macrocephala Koidz*)的干燥根茎;白芍为毛茛科(*Ranunculaceae*)芍药属(*Paeonia*)植物芍药(*Paeonia lactiflora Pall*)的去皮干燥根;水蛭为水蛭科动物蚂蝗(*Mitinnia pigra Whitman*)的干燥全体;炙甘草为豆科(*Leguminosae*)甘草属(*Glycyrrhiza L*)植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis Fisch*)的炮制加工品。上述药材均购自采芝林连锁药店,经广州中医药大学中药鉴定教研室童家^田老师鉴定,皆符合《中华人民共和国药典》标准。按组方配比称取药材,救必应20g、水蛭10g、白术10g、白芍10g、炙甘草5g。成人体质量以60kg计,临床用药量为每天55g,剂量为0.92g·kg⁻¹,大鼠给药高、中、低剂量分别按临

床用量的 20, 10, 5 倍计算, 即含生药量分别为 18.3, 9.2, 4.6 g·kg⁻¹。大鼠灌胃给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 按煎剂制备方法煎煮, 水浴浓缩至含生药量 1.83 g·mL⁻¹ 药液(即为溃结灵高剂量), 给药时根据给药剂量依次对半稀释成中剂量和低剂量, 4 ℃ 冰箱保存, 备用。

柳氮磺胺吡啶片(SASP), 上海三维制药有限公司, 批号: 20141010, 用作阳性对照药。成人体质量按 60 kg 计, 以每天 3 g 临床用药量算, 服用剂量为 0.05 g·kg⁻¹, 大鼠给药剂量按成人临床用量的 10 倍计算, 即 0.5 g·kg⁻¹, 大鼠灌胃给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 即 0.5 g 配至 10 mL。

1.3 主要试剂 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS), 美国 Sigma 公司, 批号: SLBM6263V; 无水乙醇: 天津市永大化学试剂有限公司, 批号: 20151008; 水合氯醛: 天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20111114; 大鼠 IL-2 ELISA 试剂盒: 武汉华美生物科技有限公司, 批号: CSB-E04628r; 大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒: 武汉华美生物科技有限公司, 批号: CSB-E0459r; 乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液(50X), 福州迈新生物科技研发有限公司, 批号: MNS-009810099; 免疫组化染色试剂盒: 北京康为世纪生物科技有限公司, 批号: CW2035; STAT5 多克隆抗体: Proteintech, 批号: 10253-2-AP; Foxp3 多克隆抗体: Abcam, 批号: AB78007; DEPC 水: 美国 Sigma 公司, 批号: D-5758; RNAiso plus: TaKaRa 公司, 批号: AK8406; 逆转录试剂盒: TaKaRa 公司, 批号: AK2702; SYBR Premix Ex TaqTMII: TaKaRa 公司, 批号: AK3803; Foxp3、STAT5、GAPDH 引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.4 主要仪器 CENioS 酶标仪, TECAM 公司; 3K30/V 高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; BX53 奥林巴斯正置显微镜, 上海奥林巴斯有限公司; D-8721 梯度 PCR 仪, 日本 TaKaRa 公司; NANODROP2000 超微量核酸蛋白检测仪器: 美国 Thermo Scientific 公司; QL-901 荧光定量 PCR 仪: 美国 BIO-RAD 公司。

1.5 分组、模型复制^[8]及给药 SD 大鼠, 实验前 3 d 正常饲养以适应环境。正常对照组常规饲养, 其余大鼠提前禁食不禁水 24 h, 乙醚麻醉, 用大鼠灌胃针头轻轻从肛门插入, 深度约 8 cm, 推入 TNBS 溶液 2 mL·kg⁻¹(含 25 g·L⁻¹ TNBS 和体积分数 50 % 乙

醇), 捏紧肛门平放 5 min, 术后常规饲养。造模第 3 d, 将 UC 模型大鼠随机分为模型组, 溃结灵高、中、低剂量组(18.3, 9.2, 4.6 g·kg⁻¹), 阳性药柳氮磺胺吡啶(SASP)组, 各给药组按照实验设计剂量灌胃给药, 模型组及正常组给予等量蒸馏水, 连续 10 d。末次给药后 24 h 禁食不禁水, 称体质量后, 大鼠颈椎脱臼处死。取部分病变结肠组织置于 10 % 中性缓冲福尔马林溶液中固定保存。取另一部分结肠刮取结肠黏膜组织保存于 1.5 mL 冻存管中, 至于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.6 ELISA 检测 取适量结肠黏膜, 放入玻璃匀浆器中, 按 100 mg 组织加入 1 ml 1 × PBS 溶液匀浆, 将匀浆液于 4 ℃ 5000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清, 适当稀释用于检测。按试剂盒说明书进行操作, 每孔加样量为 100 μL, 终止反应后用酶标仪在 450 nm 处测吸光度(OD)值。

1.7 免疫组化染色 按常规包埋, 切片。按试剂盒操作说明进行免疫组化染色。在光镜下, 细胞浆和细胞核内出现棕黄色颗粒即为所检测的原位蛋白, 每个切片至少拍摄 5 个不同的视野, 使用 Image Pro Plus 软件, 选取 AOI, 通过测量图中黄色表达部分来反应 Foxp3、STAT5 原位蛋白表达的“量”, 黄色表达部分用平均光密度来表示, 计算出 IOD 和 Area Sum 后, 得到平均光密度值(IOD Sum/Area Sum), 从而得到原位蛋白表达量的半定量结果。

1.8 实时荧光定量 PCR 按试剂盒说明书提取结肠黏膜组织总 RNA, 并反转录成 cDNA。根据 Foxp3、STAT5 基因, 利用 NCBI 进行引物设计, 经 GeneBank 确认无误后, 以 GAPDH 作为内参, 合成引物。Foxp3 mRNA 引物: F 5'-TGAGCTGGCTGCAA TTCTGG-3', R 5'-ATCTAGCTGCTCTGCATGAGGTGA -3'; STAT5 mRNA 引物: F 5'-GTGCCCTCAGGCTCA CTACAAC-3', R 5'-CCACATGCCTGGCAACATC-3', GAPDH 引物: F 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG -3', R 5'-ATGCTGCTGAAGACGCCAGTA-3'。25 μL 反应体系, PCR 扩增条件: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 共 40 个循环。结果采用 Ct 法行 PCR 产物相对定量分析, 计算方法如下: 首先由软件分析得出各组 Ct 值, 再按如下公式计算, Ct=Ct(目的基因)-Ct(GAPDH 基因), 各组 2^{-Ct}, 最终统计数据 = 实验组 2^{-Ct} 值 / 对照组 2^{-Ct} 值, 其中 Ct 是荧光达到阈值的循环数。

1.9 统计学处理方法 应用 SPSS17.0 软件进行统计

处理, 计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间两两进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-2、IL-10 在结肠黏膜的含量 结果见表 1, 与正常组比较, UC 模型组 IL-2, IL-10 含量明显降低; 给药后, 与 UC 模型组比较, 溃结灵高剂量组、阳性药物组 IL-2 表达明显升高, 溃结灵高、中剂量组及阳性药物组 IL-10 表达明显升高。

2.2 Foxp3、STAT5 在大鼠结肠黏膜原位蛋白的表达

表 1 溃结灵对 UC 模型结肠黏膜 IL-2、IL-10 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The impact of KD on IL-2 and IL-10 in colonic mucosa of UC model rats

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-2/pg·mg ⁻¹	IL-10/pg·mg ⁻¹
正常组	10	—	4.87 $\pm$ 0.87
模型组	9	—	3.65 $\pm$ 0.97 [△]
KD 高剂组	8	18.3	4.94 $\pm$ 0.67 ^{**}
KD 中剂组	8	9.2	4.45 $\pm$ 0.90
KD 低剂组	9	4.6	4.05 $\pm$ 1.76
SASP 组	7	0.5	4.89 $\pm$ 0.77 [*]

注: 与正常组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

结果见表 2、图 1、图 2, 与正常组比较, UC 模型组 Foxp3、STAT5 原位蛋白表达量明显降低; 给药后, 与 UC 模型组比较, 溃结灵高、中、低剂量组及阳性药物组 Foxp3、STAT5 原位蛋白表达明显升高。

表 2 溃结灵对 UC 模型结肠黏膜组织 Foxp3、STAT5 原位蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The impact of KD on the situ protein of Foxp3 and STAT5 in colonic mucosa of UC model rats

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Foxp3	STAT5
正常组	10	—	0.130 $\pm$ 0.016
模型组	9	—	0.084 $\pm$ 0.010 ^{△△}
KD 高剂组	10	18.3	0.114 $\pm$ 0.015 ^{**}
KD 中剂组	9	9.2	0.114 $\pm$ 0.012 ^{**}
KD 低剂组	10	4.6	0.186 $\pm$ 0.041 ^{**}
SASP 组	10	0.5	0.117 $\pm$ 0.020 ^{**}

注: 与正常组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 Foxp3、STAT5 mRNA 在大鼠结肠黏膜的表达

结果见表 3, 与正常组比较, UC 模型组 Foxp3、STAT5 mRNA 表达量明显降低; 给药后, 与 UC 模型组比较, 溃结灵高、中剂量组及阳性药物组 Foxp3 mRNA 表达明显升高, 溃结灵高剂量组及阳性药物组 STAT5 mRNA 表达明显升高。

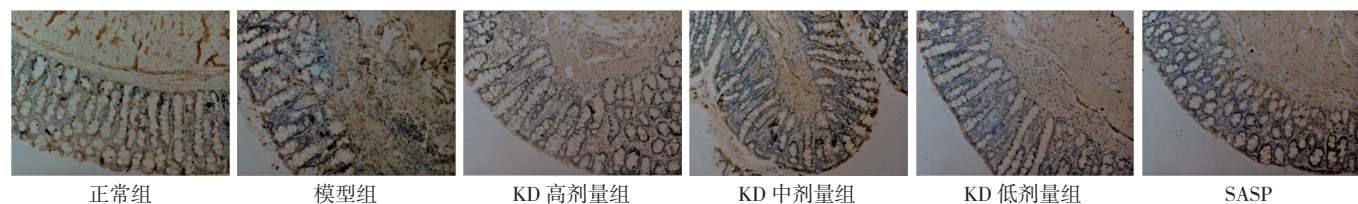


图 1 溃结灵对 UC 模型结肠黏膜组织 Foxp3 原位蛋白的影响(100 $\times$)

Figure 1 The impact of KD on the situ protein of Foxp3 in colonic mucosa of UC model rats(100 $\times$)

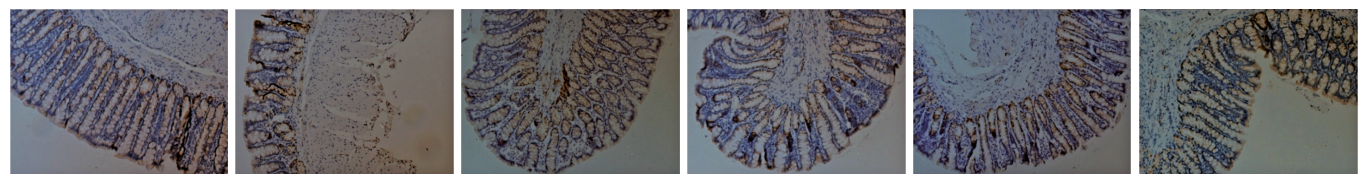


图 2 溃结灵对 UC 模型结肠黏膜组织 STAT5 原位蛋白的影响(100 $\times$)

Figure 2 The impact of KD on the situ protein of STAT5 in colonic mucosa of UC model rats(100 $\times$)

3 讨论

Treg 是一类功能独特的 CD4⁺T 细胞亚群, 不同于通常 CD4⁺T 细胞介导其各自类型的炎症反应, Treg 的主要功能是抑制炎症的产生与扩大, 通过分泌 IL-10 与 TGF- β 1 等细胞因子来抑制树突状细胞、巨噬细胞与 Th 细胞促炎细胞因子的释放, 在维持对正

常人体与肠道菌群的免疫耐受以及调控炎症反应的强度中发挥着重要作用^[9]。如果敲除 IL-10 等 Treg 相关因子的基因导致 Treg 缺乏, 将导致对肠道菌群的不耐受而出现自发性肠炎^[10]。有研究显示在 UC 等自身免疫疾病患者的外周血中 Treg 的比例显著下降, 提示 Treg 的功能异常所导致的免疫不耐受可能是 UC

表 3 溃结灵对 UC 模型结肠黏膜组织 Foxp3、STAT5 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The impact of KD on the mRNA of Foxp3 and STAT5 in colonic mucosa of UC model rats

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	Foxp3	STAT5
正常组	10	—	1.36 ± 0.34	0.52 ± 0.18
模型组	9	—	0.81 ± 0.23 ^{△△}	0.35 ± 0.18 [△]
KD 高剂组	9	18.3	1.24 ± 0.43 [*]	0.62 ± 0.23 [*]
KD 中剂组	8	9.2	1.79 ± 0.67 ^{**}	0.46 ± 0.35
KD 低剂组	9	4.6	1.21 ± 0.53	0.50 ± 0.29
SASP 组	9	0.5	1.98 ± 0.73 ^{**}	0.80 ± 0.20 ^{**}

注: 与正常组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

等疾病发生机制中的重要一环^[11]。IL-2 主要由 T 细胞产生, 主要功能为促进 T 细胞的增殖与活化^[12]。既往认为 IL-2 是人体维持免疫功能的促炎因子, 而后续研究发现, 在 IL-2 基因缺陷的小鼠中会出现 Treg 的缺乏并产生类似溃疡性结肠炎的自发性肠炎^[13], 这提示 IL-2 同时具有抑炎作用, 为 Treg 发育所必须, 并且 IL-2 的缺乏可能是 UC 中 Treg 缺乏的上游因素^[14]。Foxp3 为 Treg 特异性的转录因子, Foxp3 的持续性表达促进 Treg 的分化成熟以及 IL-10 的分泌, Foxp3 基因缺陷的小鼠无法产生发育成熟的 Treg^[15]。STAT5 则为激活 Naïve T 细胞表达 Foxp3 并发育为 Treg 的胞内信号通路。STAT5 与 Foxp3 基因上的结合位点决定了 STAT5 对 Foxp3 表达的调控^[16]。在 IL-2 信号存在的情况下, T 细胞激活的 STAT5 信号通路促进 Foxp3 的表达, 诱使 T 细胞向 Treg 方向分化, 并分泌 IL-10 产生炎症抑制的效果^[17]。

以清热健脾活血法为治则的复方溃结灵, 临床疗效确, 能明显改善 UC 引起的腹泻、腹痛、腹胀、里急后重等临床症状^[3]。本方君药救必应, 清热解毒, 祛湿止泻, 凉血止血; 臣药白术, 补气健脾, 白芍活血养阴, 水蛭活血化瘀; 甘草益气补脾, 缓急止痛, 调和诸药; 全方共奏清热健脾活血之效。目前研究报道, 救必应有抗菌、抗炎镇痛作用^[18]。芍药苷能够通过下调溃结大鼠 IL-1 β 、TNF- α 和升高 IL-4 的表达, 调节肠道异常免疫反应进而抑制炎症反应, 修复溃疡, 进而治 UC^[19]。白术水煎液可通过下调 UC 模型大鼠 IL-6、IL-17 水平的表达来实现抑制炎症细胞的分化增殖炎症介质的释放与聚集, 从而来实现抑制炎症的浸润与结构组织的破坏^[20]。水蛭主要作用是抗凝血和抗血栓形成, 对缺血再灌注损伤中的炎症因子产生和细胞凋亡有抑制作用, 对血

管内皮细胞具有保护作用^[21]。

为进一步明确 UC 的发病机制, 病情变化以及转归, 以及中医药对 UC 的作用机制, 目前在细胞因子及相关信号转导途径做了相关研究, 也取得一定进展^[22]。本实验团队对组方溃结灵治疗实验性 UC 大鼠的相关因子做了一些研究, 目前实验结果显示, TNBS 法 UC 大鼠结肠黏膜中 IL-2、IL-10, Foxp3、STAT5 蛋白原位表达以及基因表达显著低于正常对照组, 经过药物治疗后均升高。这表明结肠黏膜中 IL-2、IL-10 和 Foxp3、STAT5 与实验性溃疡性结肠炎呈负相关性。溃结灵抑制肠粘膜炎症的可能机制是: 上调 UC 结肠黏膜中 Treg 上游 IL-2 的分泌水平, 从而使 Treg 获得 STAT5 与 Foxp3 基因的活化与蛋白表达量的上升, 促进 Treg 细胞的发育与增多, 提高 IL-10 的含量。这可能是溃结灵通过影响 Treg 细胞发挥抑制炎症功能, 治疗 UC 的作用机制之一。

本文在动物实验的基础上, 从调节性 T 细胞的分化相关机制着手, 深入到分子生物学水平观察中药复方溃结灵干预溃疡性结肠炎模型大鼠所发生的微观改变, 揭示溃结灵治疗 UC 的可能作用机制。~~由此可见, 中医药在抗 UC 机制方面的深入研究有利于进一步指导临床及相关新药开发。~~

参考文献:

- [1] 中华医学会. 临床诊疗指南[M]. 京: 人民卫生出版社, 2005: 131-136.
- [2] SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. Cell, 2008, 133: 775-787.
- [3] 黄志新, 劳绍贤, 崔琦珍, 等. 溃结灵颗粒治疗活动性溃疡性结肠炎的临床和实验研究[J]. 中西医结合消化杂志, 2003, 11(3): 141-143.
- [4] 胡旭光, 王汝俊, 杜群, 等. 溃结灵对实验性溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5): 35-37.
- [5] 宋宁, 李燕舞, 巫燕莉, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜超微结构的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 73-75.
- [6] 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.
- [7] MORRIS GP, BECK PL, HERRIDGE W, et al. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in rat colon [J]. Gastroenterology, 1989, 96: 795-803.
- [8] BELL CJ, GALL DG, WALLACE JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis [J]. Am J Physiol, 1995, 268: G622-630.
- [9] LUO CT, LI MO. Transcriptional control of regulatory T cell development and function[J]. Trends in Immunology, 2013, 11(34): 531-539.

- [10] LINDSAY JO, CIESIELSKI CJ, SCHEININ T, et al. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin10 induces colonic interleukin10 production and is the rapeutic for murine colitis[J]. Gut, 2004, 3(5): 774.
- [11] TAKAHASHI M, NAKAMURA K, HONDA K, et al. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51: 677.
- [12] 吕昌龙, 李殿俊, 李一, 等. 医学免疫学[M]. 第7版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 89-90.
- [13] SETOGUCHI R, HORI S, TAKAHASHI T. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization[J]. Journal of Experimental Medicine, 2005, 201(5): 723-735.
- [14] LIAO W, LIN JX, LEONARD WJ. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy[J]. Immunity, 2013, 38(1): 13-25.
- [15] FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-336.
- [16] ZORN E, ELSON EA, MOHSENI M, et al. IL-2 Regulates FOXP3 Expression in Human CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells through A S TAT-dependent Mechanism and Induces the Expansion of These Cells in Vivo[J]. Blood, 2006, 108(5): 1571-1579.
- [17] DENNIS KL, BLATNER NR, GOUNARI F, et al. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer[J]. Current Opinion in Oncology, 2013, 25(6): 637-645.
- [18] 周宁, 郭鸿宜. 救必应干品以及新鲜品体外抗炎作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 2(12): 534.
- [19] 朱向东, 曹燕飞, 王燕, 等. 芍药苷对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织病理形态及血清抗炎因子和促炎因子平衡的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(9): 1927-1929.
- [20] 叶涵婷, 陈超, 朱曙东. 白术水煎液对溃疡性结肠炎大鼠模型及血清 IL-6、IL-17 的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2014, 37(1): 69-71.
- [21] 郭晓庆, 孙佳明, 张辉. 水蛭的化学成分与药理作用[J]. 吉林中医药, 2015, 35(1): 47-49.
- [22] 许雅清, 李海龙, 邱家权, 等. 久泻灵颗粒对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠相关细胞因子的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(4): 59-61.

(编辑: 修春)

川芎嗪与黄芪甲苷配伍对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用及机制

李李玉梅, 杨辛欣, 韩旭, 谢聪聪, 韩光雪, 张大方, 王楚盈(长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117)

摘要: 目的 研究川芎嗪与黄芪甲苷及不同浓度配伍对过氧化氢(H₂O₂)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)氧化损伤模型的保护作用及机制。方法 建立 H₂O₂ 诱导损伤模型, 将细胞分为 17 组, 空白对照组、过氧化氢(0.2 mmol·L⁻¹)模型组, 川芎嗪(40, 80, 160 μg·mL⁻¹)剂量组、黄芪甲苷(10, 20, 40 μg·mL⁻¹)剂量组及两两配伍组, MTT 法检测不同浓度川芎嗪、黄芪甲苷及其配伍对氧化损伤人脐静脉内皮细胞的增殖影响, 筛选出最佳配伍比例。检测最佳配伍组 MDA 含量和 SOD 活性, Annexin V-FITC/PI 染色荧光显微镜观察细胞凋亡率, Western Blot 检测 p-Akt 和 Akt 蛋白的表达, RT-PCR 检测 AKt mRNA 的表达。结果 与模型组相比, 川芎嗪与黄芪甲苷不同浓度配伍组均能不同程度提高细胞存活率($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 且川芎嗪(80 μg·mL⁻¹)剂量组 + 黄芪甲苷(40 μg·mL⁻¹)剂量组具有极显著差异($P < 0.001$); 川芎嗪、黄芪甲苷配伍组降低细胞 MDA 含量($P < 0.001$), 提高细胞 SOD 活力($P < 0.001$)。同时, 川芎嗪、黄芪甲苷配伍组能降低细胞凋亡率($P < 0.01$), 上调 p-Akt/Akt 蛋白($P < 0.01$), 上调 Akt 基因 mRNA 的表达($P < 0.001$)。结论 川芎嗪(80 μg·mL⁻¹) + 黄芪甲苷(40 μg·mL⁻¹)对 H₂O₂ 诱导的 HUVECs 氧化损伤有保护作用, 能缓解氧化应激诱导的 HUVECs 凋亡, 其机制与 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 川芎嗪; 黄芪甲苷; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化氢; 氧化损伤; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017) 01-0018-0

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2017. 004

收稿日期: 2016-09-03

作者简介: 李玉梅, 讲师, 博士研究生。研究方向: 中药复方药效作用物质基础及机理研究。通信作者: 王楚盈, 吉林省长春市人, 长春中医药大学药学院讲师, 博士, 研究方向: 中药复方药效作用物质基础及机理研究, Email: chuying820713@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173597), 吉林省卫生计生青年科研课题(2014Q046)。