

本文引用: 蔺晓源, 徐菲, 张嘉伦, 赵应松, 王敏, 刘杰民, 胡国恒. 健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠 CD86 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(11): 1321-1325.

健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠 CD86 和 ICAM-1 表达的影响

蔺晓源^{1,2,3}, 徐菲⁴, 张嘉伦⁴, 赵应松⁴, 王敏⁴, 刘杰民⁵, 胡国恒^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 3. 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科, 湖南长沙 410208; 4. 贵阳中医学院, 贵州贵阳 550002; 5. 贵州省人民医院, 贵州贵阳 550002)

[摘要] **目的** 观察健脾益肠散对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠 CD86 分子(CD86)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达的影响, 探讨其对 UC 肠黏膜的免疫保护机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠先随机分为空白组和造模组, 造模组采用 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)溶液灌肠法制备 UC 大鼠模型, 待模型复制成功后再将造模组随机分为模型组、西药组和中药高、中、低剂量组; 干预 21 d 后, 免疫组化法检测各组大鼠结肠组织中 CD86 的阳性表达, Western Blot, RT-PCR 法分别检测结肠中 ICAM-1 的蛋白和 mRNA 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织中 CD86 的阳性表达以及 ICAM-1 的蛋白和 mRNA 表达均显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药高、中、低剂量组和西药组 CD86、ICAM-1 的表达均不同程度地降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且以中药高剂量组最为明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 健脾益肠散可能通过降低结肠组织中 CD86、ICAM-1 的表达水平起到对 UC 结肠黏膜的免疫保护作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 健脾益肠散; CD86 分子; 细胞间黏附分子-1

[中图分类号] R285.5; R656.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.11.006

Effects of Jianpi Yichang Powder on Expression of CD86 Molecule, Intercellular Adhesion Molecule-1 in Rats with Ulcerative Colitis

LIN Xiaoyuan^{1,2,3}, XU Fei⁴, ZHANG Jialun⁴, ZHAO Yingsong⁴, WANG Min⁴, LIU Jiemin⁵, HU Guoheng^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. The Domestic First Class Construction Discipline of Chinese Medicine in Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China; 5. People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Jianpi Yichang Powder (JYP) on the expressions of CD86 molecule (CD86) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ulcerative colitis (UC) rats, and to explore its immunoprotective mechanism of UC intestinal mucosa. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into a blank group and a modeling group. The UC models were established by the method of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) solution clyster. Then the successfully modeled rats were randomly divided into a model group, a western medicine group, a high, middle, and low dosage groups of Chinese herbal medicine. After intragastric administration for 21 days, immunohistochemical method was used to detect the positive expression of CD86. Western Blot and Real-Time PCR methods were used to detect the expression of ICAM-1 protein and mRNA in colonic tissue of rats in each group. **Results** The positive expression of CD86 and the protein and mRNA

[收稿日期] 2018-12-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560773)。

[作者简介] 蔺晓源, 男, 在读博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 中医药防治内科重大疾病研究。

[通讯作者] * 胡国恒, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: hugh9198@163.com。

expressions of ICAM-1 in colonic tissue of the model group were significantly increased than those in the blank group ($P<0.01$). The expressions of CD86 and ICAM-1 in high, middle, low dose groups of Chinese herbal medicine groups and western medicine groups were decreased than the model group in different degrees ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the high dose group of Chinese herbal medicine was the most obvious ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** JYP may play an immune protective role on colon mucosa of UC by decreasing the expression of CD86, ICAM-1 in colon tissue.

[**Keywords**] ulcerative colitis; Jianpi Yichang Powder; CD86 molecule; intercellular adhesion molecule-1

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的以腹痛、腹泻和便血等症状和体征为主要临床表现的慢性炎症性肠病^[1]。UC病因尚不清楚,研究认为其发病与遗传、环境、感染、微生物群失调和免疫应答等因素密切相关^[2]。目前UC的西医治疗药物常包括柳氮磺胺嘧啶等氨基水杨酸制剂,布地奈德等糖皮质激素、硫唑嘌呤等免疫抑制剂,英夫利昔等生物制剂及微生态制剂,临床多联合用药,虽有成效,但仍面临不良反应大、易复发等诸多问题。健脾益肠散是基于UC“本虚标实”的中医病机组方的董菲洛教授经验方,临床治疗UC安全有效,并能明显改善患者机体的免疫功能^[3]。为了进一步明确健脾益肠散治疗UC的作用靶点,鉴于CD86分子(CD86)和细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)异常已被证实在UC发病的免疫机制中起重要作用^[4-5]。因此,本研究观察健脾益肠散对UC模型大鼠结肠组织CD86、ICAM-1表达的影响,以深入探讨其对UC结肠黏膜的免疫保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD大鼠60只,SPF级,雄性,体质量180~220 g,由重庆腾鑫华阜实验动物销售有限公司提供,许可证号:SCXK-(军)2012-0011。饲养于SPF级实验动物房,饲养温度21~25℃,湿度50%~70%,符合饲养环境标准要求。所有大鼠自由饮水、进食,每2天更换一次垫料。

1.2 实验药物

健脾益肠散全方由太子参15 g,黄芪15 g,白术12 g,木香6 g,白豆蔻6 g,茯苓12 g,芡实12 g,败酱草30 g,补骨脂20 g,炙甘草6 g组成。中药饮片均购自贵州省中医院门诊中药房,浓缩成药液含量分别为15、10、5 g/mL的药液冰箱冷藏备用。西药柳氮磺吡啶肠溶片(上海福达制药有限公司,规格:0.25 g/片),配制成浓度为22.1 mg/mL的药液冷藏备用。

1.3 主要试剂与仪器

CD86、ICAM-1兔抗多克隆抗体(abcam),PCR引物合成(南京金斯瑞生物科技有限公司),引物序列:ICAM-1-F:CGGGATGGTGAAGTCTGT,ICAM-1-R:GGCGGTAATAGGTGTAATG,产物片段长度200 bp;GAPDH-F:CAAGTTCACCGCACAG, GAPDH-R:CCAGTAGACTCCACGACAT,产物片段长度138 bp。BCA蛋白浓度测定试剂盒(Bio-Swamp),蛋白质Marker(Thermo),逆转录试剂盒(TAKARA),PCR试剂盒(KAPA Biosystems),2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS, Sigma)。Z32HK高速冷冻离心机(德国Hermle),RM2235石蜡切片机(德国莱卡),MK3酶标仪(芬兰雷勃),BX51显微镜和图像分析系统(日本奥林巴斯),Mini Protean tetra cell蛋白印记系统、T100梯度PCR扩增仪、CheemiDoc XRS+Imager化学发光系统(美国BIO-RAD),Realplex 2荧光定量PCR仪(德国Eppendorf)。

1.4 动物分组与模型复制

将60只大鼠先按体质量用随机数字法分为2组,正常组(10只)和造模组(50只)。造模组参考文献方法^[6]将大鼠用水合氯醛腹腔注射麻醉,然后肛内8 cm处注入TNBS溶液制备UC大鼠模型。待模型复制成功后再将造模组随机分为5组,分别为空白组、模型组、西药组和健脾益肠散3个剂量组(简称中药高、中、低剂量组),每组10只。

1.5 干预与标本取材

从造模第3天起,西药组给予0.3 g/kg的柳氮磺吡啶肠溶片药液,中药高、中、低剂量组分别给予204、136、68 g/kg的健脾益肠散药液,模型组给予蒸馏水。灌胃体积量均为13.6 mL/kg,连续灌胃21 d。

空白组大鼠和各给药组大鼠在最后一次灌胃后禁食不禁水24 h,然后予以水合氯醛麻醉。冰盒上剪取距离肛门10 cm处的末端结肠,其中一小段用生理盐水漂洗后装入冻存管中放置在-80℃冰箱中保存供Western Blot和RT-PCR检测使用,另一小段放入多聚甲醛中供免疫组化检测使用。

1.6 指标检测

1.6.1 CD86 阳性表达的免疫组化法检测 每组随机取出结肠组织标本 5 个,流水冲洗,不同浓度的乙醇逐级脱水,置入纯乙醇和二甲苯的等体积混合液中透明,石蜡包埋切片,一抗(CD86 抗体,稀释比例 1:100)孵育,maxvision 二抗孵育,DAB 显色,苏木素复染 3 min,透明、封片。使用 400 倍镜选取阳性表达(以胞膜或胞浆内出现棕黄色颗粒染色为标志)不重复的 5 个视野拍片,最后使用图像分析系统分析 CD86 阳性染色的平均 OD 值。

1.6.2 ICAM-1 蛋白表达的 Western Blot 法检测 每组随机取出结肠组织标本 5 个,按每 20 mg 组织加入 150~250 μ L 裂解液提取蛋白,使用酶标法进行蛋白定量,制备 SDS-PAGE 胶(下层分离胶选用 12%的胶),每孔上样 10 μ g 蛋白,经电泳、湿转膜、5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入一抗(ICAM-1 抗体,稀释比例 1:1 000)室温孵育 1 h、1:10 000 稀释 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,显色后将膜置于化学发光系统中检测。

1.6.3 ICAM-1 mRNA 表达的 RT-PCR 法检测 每组随机取出结肠组织标本 3 个,根据 Real-Time PCR 的操作方法进行组织总 RNA 的提取、cDNA 第一条链的合成(总 RNA 中 DNA 的消除;总 RNA 中 DNase 1 的消除;反转录:42 $^{\circ}$ C,60 min;70 $^{\circ}$ C,15 min;16 $^{\circ}$ C,hold) 和 PCR 扩增。数据采用仪器自带软件 qbase plus 分析每个样本待测基因相对于内参基因 GAPDH 的相对表达量。

1.7 统计学处理

实验数据均采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间的比较满足正态性检验后,方差齐时采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,方差不齐时采用 Tamhane's T2 法。不满足正态性分布的采用非参数检验。 $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠结肠组织 CD86 的阳性表达

与空白组比较,模型组 CD86 的阳性表达显著增多($P<0.01$);各给药组均可不同程度地降低 CD86 的阳性表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且中药高剂量组优于其他给药组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),中药低剂量组不

及中药中剂量组和西药组($P<0.05$),而中药中剂量组与西药组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠结肠组织 CD86 阳性表达 OD 值、ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	CD86*	ICAM-1 蛋白*	ICAM-1 mRNA*
空白组	0.09 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	1.00 \pm 0.08
模型组	0.62 \pm 0.10 ^{###}	1.08 \pm 0.09 ^{##}	1.29 \pm 0.12 ^{##}
西药组	0.38 \pm 0.07 ^{△△△*}	0.62 \pm 0.05 ^{△△△**}	1.14 \pm 0.11 ^{△*}
中药低剂量组	0.50 \pm 0.09 ^{△△*}	0.92 \pm 0.07 ^{△△**}	1.18 \pm 0.13 ^{△*}
中药中剂量组	0.35 \pm 0.06 ^{△△*}	0.81 \pm 0.06 ^{△△**}	1.10 \pm 0.10 ^{△△}
中药高剂量组	0.18 \pm 0.04 ^{△△}	0.40 \pm 0.04 ^{△△}	1.05 \pm 0.09 ^{△△}

注:与空白组比较,### $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与中药高剂量组比较,☆ $P<0.05$,☆☆ $P<0.01$,与中药低剂量组比较,★ $P<0.05$,★★ $P<0.01$;与西药组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;* $n=5$,** $n=3$

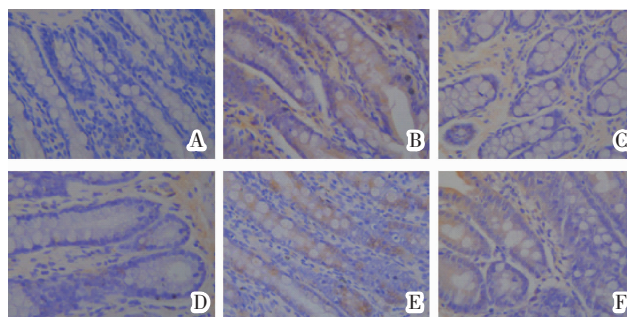


图 1 各组结肠 CD86 的阳性表达(DAB 染色, $\times 400$)

2.2 各组大鼠结肠组织 ICAM-1 的蛋白表达

与空白组比较,模型组 ICAM-1 蛋白表达明显增多($P<0.01$);各给药组与模型组比较,ICAM-1 的蛋白表达均不同程度地减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且以中药高剂量组最为明显($P<0.01$),而中药中、低剂量组与西药组比较差异亦有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 2。

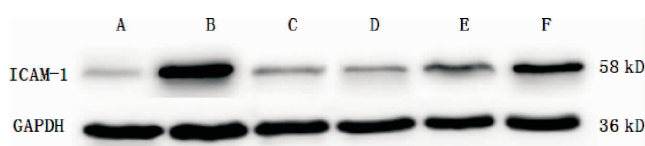


图 2 各组结肠 ICAM-1 蛋白免疫印迹电泳图

2.3 各组大鼠结肠组织 ICAM-1 mRNA 表达

模型组 ICAM-1 mRNA 表达较空白组显著升

高($P<0.01$);各给药组 ICAM-1 的 mRNA 表达与模型组比较均不同程度地降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且中药高剂量组优于中药低剂量组和西药组($P<0.05$),而中药中、低剂量组与西药组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

3 讨论

树突状细胞(dendritic cells, DC)是功能最强大的抗原提呈细胞,也是激发免疫应答的始动细胞。DC 参与 UC 肠道黏膜免疫激活和免疫耐受,结肠黏膜 DC 浸润的频率与 UC 活动性炎症的严重性显著关联^[7]。成熟 DC 高表达共刺激分子 CD86 和黏附分子 ICAM-1 等,可有效激活 T 细胞免疫应答^[8]。而当特定的 CD86、ICAM-1 等缺乏时, T 细胞活化受到抑制,进而导致外周免疫耐受产生。Scarpa M 等^[4]研究表明, CD86 的表达在 UC 患者中明显存在,而健康受试者体内未检测到 CD86,且 CD86 的表达与疾病的持续时间呈负相关,其研究证实了 CD86 在 UC 发病中的主要作用。而早在 Nakazawa A 等^[9]探讨共刺激分子 CD86 在人结肠上皮细胞中的表达及其在炎症结肠黏膜 T 细胞活化中的作用时就发现,抗原提呈细胞可通过 CD86 在炎症结肠黏膜中的表达促进 T 细胞的活化。TNBS 诱导的 UC 模型大鼠结肠黏膜 ICAM-1 的阳性表达较正常大鼠明显增强^[10]。柳氮磺吡啶可降低老年 UC 患者肠黏膜 ICAM-1 的 mRNA 表达,检测 ICAM-1 水平可作为判断 UC 疗效的指标^[11]。我们前期的研究也表明 UC 模型大鼠血清 ICAM-1 含量较正常大鼠显著升高,免疫组化结果则证实其在结肠中的阳性表达亦高于正常大鼠^[12]。因此, CD86 和 ICAM-1 在 UC 发病的免疫应答机制中起重要作用。

UC 属中医学“泄泻”“肠癖”等范畴,其本在于脾气亏虚,其标在于气滞、湿热和血瘀。若饮食失摄,脾胃运化失司,则脾气虚弱,肠胃不固。气虚无以御邪,邪留肠间,日久不化,终致气滞、湿热、血瘀复合而伤,溃肠化疡,日久则更易伤及先天肾元致使疾病缠绵不愈^[13]。王爱华教授也认为, UC 的根本病机为本虚标实,脾虚失运为其本,湿热、热毒为其标,日久夹瘀,脾肾双亏^[14]。因此,针对此本虚标实之证治宜扶正祛邪、标本兼治。健脾益肠散方中黄芪补气固

表、敛疮生肌、固肠御邪为君;太子参益气健脾,《中药志》言其:“治脾虚泄泻”;白术健脾益气、燥湿利水,《药性论》言其:“主多年气痢,止下泄”;白豆蔻化湿行气;木香行气止痛、抗菌止泻,《日华子本草》言其:“止泻,治痢疾”;败酱草清热行瘀消痈,共为臣药。补骨脂补肾止泻,《本草纲目》言其:“治肾泄,通命门”;芡实益肾补脾止泻;茯苓健脾渗湿,共为佐药。甘草补脾益气,缓急止痛,调和诸药为使。现代药理研究表明,黄芪中的黄芪多糖对非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫均具有明显的促进作用^[15]。太子参多糖粗提物能升高 CD3、CD4、CD4/CD8,具有增强辅助性 T 细胞的作用,可增强免疫功能^[16]。此外,白术的免疫调节作用,茯苓、补骨脂的增强免疫、抗炎作用也得到证实^[17-18]。而甘草黄酮类成分是甘草用于腹部解痉、“缓急止痛”功效的主要活性成分^[19]。

课题组在前期的实验研究中发现,健脾益肠散可能通过促进热休克蛋白 70 的表达、降低 CD40 分子的表达而起到对 UC 大鼠结肠黏膜的免疫保护作用^[20-21]。本研究采用经典的 TNBS/乙醇法复制 UC 大鼠模型,结果显示,模型大鼠结肠 CD86 的阳性表达以及 ICAM-1 的蛋白和 mRNA 表达均显著高于正常大鼠,说明 UC 肠黏膜的免疫应答被有效激活。健脾益肠散高、中、低剂量均可不同程度地降低 CD86 和 ICAM-1 的表达,且以健脾益肠散高剂量效果最为显著,也明显优于西药组。同时表明健脾益肠散治疗 UC 的作用机制可能与下调 CD86 的阳性表达,降低 ICAM-1 的蛋白和 mRNA 表达,进而通过调节机体免疫应答向免疫耐受方向发展而减轻免疫损伤有关。

参考文献

- [1] 陈晓峰,谢 君.不同芍药甘草配伍用于溃疡性结肠炎的治疗作用及机制研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1074-1077.
- [2] 甄建华,黄光瑞.溃疡性结肠炎病因和发病机制的现代医学研究进展[J].世界华人消化杂志,2019,27(4):245-251.
- [3] 刘杰民,黄盛文,董菲洛.健脾益肠散合固本保元腹袋治疗溃疡性结肠炎的疗效及机制[J].吉林中医药,2011,31(1):42-43.
- [4] SCARPA M, BEHBOO R, ANGRIMAN I, et al. The role of costimulatory molecules CD80 and CD86 and IFN γ in the pathogenesis of ulcerative colitis[J]. Digestive Diseases and Sci-

- ences, 2004, 49(11-12): 1738-1744.
- [5] 陈文敏,江 琼,石永江.川芎嗪对实验性结肠炎 ICAM-1 表达的影响[J].中成药,2012,34(1):154-156.
- [6] 顾培青,沈 洪,朱 磊,等.清肠化湿方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 PPAR- γ ,NF- κ B 及 MUC2,TFF3 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(3):79-85.
- [7] 刘端勇,徐 荣,黄敏芳,等.树突状细胞在溃疡性结肠炎发病中的价值与途径分析[J].世界中西医结合杂志,2016,11(4):576-578.
- [8] BERNARDO D, SANCHEZ B,AL-HASSI H O, et al. Microbiota/host crosstalk biomarkers: regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to Lactobacillus extracellular encrypted peptide[J].PLoS One,2012,7(5):e36262.
- [9] NAKAZAWA A, WATANABE M, KANAI T, et al. Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa[J]. Gastroenterology, 1999, 117(3):536-545.
- [10] 陈冠儒,张 怡,郑育卿,等.芪附理中灌肠方对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-8、IL-10 及肠黏膜 ICAM-1 表达的影响[J].中药药理与临床,2017,33(4):122-125.
- [11] 吴军霞,马阿火.柳氮磺吡啶联合糖皮质激素对老年溃疡性结肠炎患者疗效、免疫功能血清炎症因子及肠黏膜 NF- κ B、ICAM-1、VCAM-1 的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(7):1630-1632.
- [12] 蔺晓源,余 星,雷贵玥,等.健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠 ICAM-1 的影响[J].中医药导报,2017,23(21):22-24.
- [13] 刘杰民,蔺晓源,王 敏,等.董非洛教授诊治溃疡性结肠炎经验[J].长春中医药大学学报,2013,29(4):617-618.
- [14] 朱 卫,高 亚,王爱华,等.王爱华教授辨治溃疡性结肠炎经验[J].湖南中医药大学学报,2017,37(1):48-51.
- [15] 芮 雯,李婵艺,陈宏远.黄芪多糖的结构表征与生物活性研究进展[J].中药新药与临床药理,2019,30(2):264-270.
- [16] 汪剑飞.太子参药理研究新进展[J].实用药物与临床,2013,16(4):333-334.
- [17] 张晓娟,左冬冬.白术化学成分及药理作用研究新进展[J].中医药信息,2018,35(6):101-106.
- [18] 刘 森,吴玉冰.药食同源植物茯苓的研究现状与展望[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1476-1480.
- [19] 张明发,沈雅琴.甘草消化系统药理研究进展[J].上海医药,2009,30(6):264-267.
- [20] 蔺晓源,余 星,雷贵玥,等.健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 HSP70 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(22):91-96.
- [21] 刘杰民,张 瑜,古 娟,等.健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠 CD40 表达的影响[J].中医药信息,2018,35(5):5-8.

(本文编辑 杨 璞)