

本文引用: 陆文洪, 王真权, 熊家青, 刘丽芳, 李 逵. 探究芩柏加减方通过 NF- κ B/TNF- α 信号通路对溃疡性结肠炎的保护机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1793–1802.

探究芩柏加减方通过 NF- κ B/TNF- α 信号通路 对溃疡性结肠炎的保护机制

陆文洪¹, 王真权¹, 熊家青², 刘丽芳^{2*}, 李 逵^{2*}

1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410021

[摘要] **目的** 通过网络药理学和动物实验探讨芩柏加减方通过核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)/肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)信号通路对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的保护机制。**方法** 将48只SPF级SD大鼠利用2,4,6-三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)建立UC模型,造模成功后随机分为模型组(以生理盐水灌肠)、奥沙拉嗪组(以200 mg/kg奥沙拉嗪灌肠)、芩柏加减方低剂量组(以1.43 g/kg芩柏加减方灌肠)和芩柏加减方高剂量组(以2.86 g/kg芩柏加减方灌肠),每组12只,每天灌肠2次,连续14 d,另取12只正常饲养的SD大鼠作为正常对照组。于给药第1、7、14天每组随机取4只大鼠进行麻醉采血并取结肠组织。采用免疫组织化学法检测结肠组织中核因子 κ B亚基p65亲和肽(nuclear factor κ B p65, NF- κ B p65)、TNF- α 、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达来评价芩柏加减方对UC大鼠的影响,同时采用TUNEL荧光法检测评价大鼠结肠组织细胞凋亡情况;利用ELISA法评价血清中细胞因子NF- κ B p65、TNF- α 、IL-10、Caspase-3的水平差异变化情况。**结果** 通过网络药理学富集分析发现芩柏加减方中5种主要活性成分与UC成明显相关性且与NF- κ B p65/TNF- α 信号通路密切相关。经UC造模发现:与正常对照组比较,模型组大鼠结肠组织中TNF- α 、Caspase-3和NF- κ B p65水平均升高($P<0.05$),IL-10水平显著降低($P<0.05$)。HE染色结果显示,正常对照组大鼠结肠腺体排列整齐,未见炎性浸润;模型组的结肠腺体排列紊乱,肌底膜断裂且伴有明显的炎性浸润,凋亡指数相比正常对照组均升高($P<0.05$);奥沙拉嗪组及芩柏加减方低、高剂量组随着给药时间的延长,结肠病理损伤均得到不同程度的缓解。经检测给药14 d后,血清中TNF- α 、Caspase-3、IL-10和NF- κ B p65水平结果与组织病理检测结果高度一致性。相比模型组,奥沙拉嗪组、芩柏加减方高剂量组大鼠血清中TNF- α 、Caspase-3和NF- κ B p65含量明显降低($P<0.05$),IL-10水平显著升高($P<0.05$)。**结论** 芩柏加减方对TNBS诱导的UC模型具有一定保护作用,能降低细胞凋亡指数,可能是通过调节NF- κ B/TNF- α 信号通路来降低炎症因子分泌、减轻机体炎症反应、提高抗炎因子表达、促进黏膜愈合来实现。

[关键词] 芩柏加减方;溃疡性结肠炎;肿瘤坏死因子- α ;核因子 κ B亚基p65亲和肽;白细胞介素-10;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.007

Protective mechanism of modified Qinbo Formula on ulcerative colitis through NF- κ B p65/TNF- α signaling pathway

LU Wenhong¹, WANG Zhenquan¹, XIONG Jiaqing², LIU Lifang^{2*}, LI Kui^{2*}

1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective mechanism of modified Qinbo Formula on ulcerative colitis (UC) through nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p65/tumor necrosis factor- α (TNF- α) signaling pathway by network pharmacology and animal

[收稿日期]2023-06-02

[基金项目]湖南省教育厅科研课题(20C1422);湖南省普通高等学校教学改革研究项目(HNJG-2021-0586);湖南中医药大学教学改革立项项目(2020-JG042);湖南中医药大学学院联合基金教学改革研究重点项目(2022-LHJG003)。

[第一作者]陆文洪,男,博士研究生,主治医师,研究方向:中医外科疾病防治。

[通信作者]* 李 逵,男,硕士研究生,主治医师,E-mail:310607@hnu.edu.cn;刘丽芳,女,博士,主任医师,E-mail:Linf@126.com。

experiments. **Methods** Forty-eight SPF SD rats were used to establish UC model by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). After successful modeling they were randomly divided into model group (enema with normal saline), olsalazine group (enema with 200 mg/kg olsalazine), low-dose modified Qinbo Formula group (enema with 1.43 g/kg modified Qinbo Formula), and high-dose modified Qinbo Formula group (enema with 2.86 g/kg modified Qinbo Formula), with 12 rats in each group, twice a day for 14 consecutive days. And another 12 SD rats were taken as normal control group (normal feeding). Then, 4 rats in each group were randomly selected and anaesthetized for blood collection and colon tissue sampling on the 1st, 7th, and 14th day after administration. The expressions of NF- κ B p65, TNF- α , interleukin-10 (IL-10), and Caspase-3 in colon tissue were determined by immunohistochemical (IHC) to evaluate the effects of modified Qinbo Formula on UC rats. Meanwhile, TUNEL fluorescence method was used to evaluate the apoptosis of colon tissue cells in rats, and ELISA was used to evaluate changes in level differences of NF- κ B p65, TNF- α , IL-10, and Caspase-3 in serum. **Results** Based on network pharmacology enrichment analysis, it was found that the five major active ingredients in modified Qinbo Formula were significantly associated with UC and also closely related to the NF- κ B p65/TNF- α signaling pathway. Through UC modeling, compared with the normal control group, the levels of TNF- α , Caspase-3, and NF- κ B p65 in colon tissue of rats in the model group significantly increased ($P<0.05$), while the level of IL-10 significantly decreased ($P<0.05$). HE staining showed that the colonic glands of the normal control group were arranged neatly and regularly without inflammatory infiltration, but the colonic glands of the model group were arranged in disorder, with ruptured muscle basement membrane and obvious inflammatory infiltration, and the apoptosis index was higher than that of the normal control group ($P<0.05$). The pathological damage of colon was alleviated to varying degrees in the olsalazine group and the low- and high-dose modified Qinbo Formula groups with the prolongation of administration time. After 14 days of administration, the levels of TNF- α , Caspase-3, and NF- κ B p65 in serum were highly consistent with the results of histopathological examination. Compared with the model group, the levels of TNF- α , Caspase-3, and NF- κ B p65 in serum of rats in the olsalazine group and the high-dose modified Qinbo Formula group were significantly lower ($P<0.05$), while the level of IL-10 was significantly higher ($P<0.05$). **Conclusion** Modified Qinbo Formula has certain protective effects on TNBS induced UC model and can reduce the apoptosis index, which may be achieved by regulating the NF- κ B/TNF- α signaling pathway to reduce inflammatory factors secretion and the body's inflammatory response, increase the expression of anti-inflammatory factors, and promote mucosal healing.

[**Keywords**] modified Qinbo Formula; ulcerative colitis; tumor necrosis factor- α ; nuclear factor kappa-B p65; interleukin-10; Caspase-3

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病,以结肠黏膜连续性、弥漫性炎症改变为特点,病因未明,暂无法治愈^[1]。其临床表现为持续性、反复性的腹泻、腹痛,伴随黏液脓血便。目前,多认为 UC 是一种由遗传背景与环境因素相互作用导致的慢性炎症性疾病^[2],可能存在多基因、多环节的遗传背景,个体免疫因素也参与其中^[3-5]。近年来,我国 UC 发生率有升高趋势^[6-8],患病率约为 11.6/100 万^[9]。目前,尚缺乏有效的治疗方式。现有研究显示,UC 患者体内促炎因子呈高表达,尤其在活动期,多种炎症因子参与 UC 的病理过程^[10]。研究发现,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)/白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)信号通路在 UC 发展中起关键作用^[11-12]。

中医学虽无 UC 病名,但根据其症状,可以归属于“肠癖”“滞下”“下利”“久痢”“休息痢”等范畴,中医学辨证论治在改善该病临床症状和预防复发等方面具有一定的优势^[13-14]。本课题组通过长期的临床观察和研究,认为 UC 发病与“气虚”“湿滞”“血瘀”等病机有关,本病的显著特点是“虚中有实”“虚实夹杂”,并针对“久病多虚”“无湿不成泄”等病机特点,以“益气除湿祛瘀”立法,将湖南中医药大学第二附属医院自制方剂“复方芩柏颗粒剂”化裁成芩柏加減

方,发现其能明显改善 UC 患者的临床症状^[15],但其具体机制尚不明确。近年来,随着系统生物学及计算机学科的高速发展,网络药理学应运而生,其主要用于探究药物与疾病之间的相互作用关系,并建立“分子-靶点”的网络模式^[16]。本文运用网络药理学方法,构建芩柏加減方成分-靶点网络,通过建立大鼠 UC 模型,旨在探讨芩柏加減方对 UC 的作用机制,为中医药治疗 UC 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60 只 SPF 级 SD 大鼠,体质量(220 $\pm$ 10) g,雌雄各半,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,动物质量合格证编号:SCXK(辽)2020-0001。于室温(22 $\pm$ 1)℃、相对湿度 50% $\pm$ 5%环境下饲养。实验通过湖南中医药大学第一附属医院实验动物委员会审查批准(编号:ZYFY20210528)。

1.2 主要药品及试剂

芩柏加減方是由湖南中医药大学第二附属医院自制方剂“复方芩柏颗粒剂”化裁而成,由 13 味中药组成:党参 20 g,炒白术 20 g,生黄芪 20 g,黄芩 10 g,黄柏 10 g,秦艽 10 g,当归 12 g,桃仁 6 g,防风 10 g,泽泻 10 g,丹参 12 g,制大黄 10 g,延胡索 10 g。生

药均由医院中药房提供。

注射用异戊巴比妥钠(上海上药新亚药业,批号:H31021725);3-硝基苯磺酸水合物(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:2508-19-2);大鼠核因子 κ B亚基p65亲和肽(nuclear factor κ B p65,NF- κ B p65)ELISA试剂盒、大鼠TNF- α ELISA试剂盒、大鼠IL-10 ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-EL-R0674c、E-EL-R2856c、E-EL-R0016c);大鼠半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)ELISA试剂盒(武汉云克隆生物科技股份有限公司,货号:SEA626Ra);Caspase-3抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号:9661S);NF- κ B p65抗体、TNF- α 抗体、IL-10抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:10745-1-AP、60291-1-Ig、60269-1-Ig);TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(FITC)[翌圣生物科技(上海)股份有限公司;货号:40306ES50];DAPI、抗荧光淬灭封片剂(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C1002、0100-01)。

1.3 主要仪器

荧光正置显微镜、荧光倒置显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司,型号:BX53、IX53];低速离心机、电热恒温培养箱(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650-W、ICV-450);Flex Station 3多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司,型号:Flexstation3);脱水机、组织摊烤片机、抗原修复用电陶炉、包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JT-12J、JK-6、SK-109G、JB-P5);病理切片机(沈阳恒松科技有限公司,型号:RM2016);切片刀(日本羽毛Feather公司,型号:R35);载玻片及盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司,型号:188105W)。

1.4 药液制备

芩柏加减方溶液由湖南省中医院药剂科制备,其中13味生药共160 g,加入12倍蒸馏水浸泡30 min后武火煮沸,继续文火煎煮30 min,消毒纱布过滤药液后,加入10倍蒸馏水煎煮30 min,合并2次滤液。根据“动物与人的每千克体质量剂量折算系数表”计算大鼠灌肠的中药剂量。临床上,芩柏加减方的服用剂量约为160 g/70 kg,按照大鼠与人的换算系数为6.25,则得出芩柏加减方换算出大鼠使用剂量为14.285 g/kg,按照一只大鼠体质量约0.2 kg核算,则灌胃高剂量为2.86 g/0.2 kg。

1.5 芩柏加减方治疗UC的物质基础探索

通过中药系统药理学数据库和分析平台TCM-SP检索获取“党参”“白术”“黄芪”“黄芩”“黄柏”“延

胡索”“当归”“桃仁”“丹参”“防风”“秦艽”“泽泻”“大黄”的有效化学成分的数据信息,借助毒药物动力学参数进行活性成分筛选,以平台推荐的设定条件“OB $\geq$ 30%,DL $\geq$ 0.18”为筛选条件,并利用TCM-SP靶点预测模型预测所获得的活性成分的可能作用靶点。在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得筛选后成分的“Canonical SMILES”,导入Swisstarget Prediction数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)进行成分的靶点预测分析,汇总“Probability $\geq$ 0”的靶点预测结果并剔除重复数据。借助UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)中UniProKBt检索功能,以“Homo sapiens”为物种条件,将剔除重复后靶点名称校正为“Official Gene Symbol”。借助基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)数据库的GEO2R分析GSE75214数据集。该芯片数据的原始文件包含了97例UC患者与11例健康人结肠样本组织。利用生物信息学之Robust阵列平均值算法(Robust multiarray average, RMA)背景矫正和矩阵数据归一化处理其原始文件,利用limma二次分析芯片数据结合P值和差异倍数(fold change, FC)进行相关数值的筛选,其中显著差异基因的筛选条件为P<0.05, FC>2。获得与“芩柏加减方”相关靶点结合获得“芩柏加减方”治疗UC的靶点,将其定义为共同靶点。借助集成生物信息学工具分析平台(<https://david.ncifcrf.gov/>)对共同靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)功能和京都基因和基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路富集分析,整理相关数据借助Cytoscape软件构建调控网络进行可视化展示。

1.6 造模方法

采用2,4,6-三硝基苯磺酸(ethanol-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)构建UC大鼠模型^[7]。大鼠适应性饲养1周后,禁食不禁水24 h,实验时用2%的异戊巴比妥钠按2.3 mg/kg剂量进行腹腔注射麻醉大鼠。用300 mL乙醇液将TNBS配制成50 g/L溶液,而后将直径约2.0 mm、长约12 cm的硅胶管经液状石蜡润滑后由肛门轻缓插入大鼠体内深约8 cm达结肠部位,按100 mg/kg剂量缓慢注入TNBS/乙醇混合液,再注入约0.4 mL的空气,以使硅胶管中的药液全部注入肠腔,捏紧肛门,提起大鼠尾部保持倒立,持续约10 min,使造模剂充分渗入大鼠肠腔内。造模完成后,仰卧归笼,保温灯照射至大鼠自然苏醒,正常自由饮食。以大便带血(或隐血阳性)、稀便或体质量减轻作为造模成功的标志^[7]。

1.7 分组和干预方法

TNBS 法造模 24 h 后开始药物干预。实验分为正常对照组($n=12$)和造模组($n=48$),造模组再随机分为 4 组:给予等剂量生理盐水的模型组、给予 200 mg/kg 奥沙拉嗪组、给予 2.86 g/0.2 kg 芩柏加减方高剂量组、给予 1.43 g/0.2 kg 芩柏加减方低剂量组,每组 12 只,每天 2 次灌肠给药,连续干预 14 d。

1.8 动物取材

给药后分别于第 1、7、14 天,每组随机取 4 只大鼠按 2.3 mg/kg 剂量腹腔注射 2%异戊巴比妥钠麻醉大鼠,剖腹暴露腹主动脉,负压管采血,2 000 r/min 离心 5 min 后,取上层血清,置于 -80°C 保存备用。沿肠系膜纵轴剖开,游离的结肠组织冰生理盐水清洗,取距肛门 8 cm 处组织一分为二。一部分用 4%多聚甲醛固定,用于常规石蜡包埋、切片,用于观察结肠组织病理学变化;另一部分迅速投入液氮中,后转入 -80°C 冰箱保存。

1.9 结肠组织病理学评分标准

取全段结肠剪开,生理盐水洗净,平铺于白板上置于放大镜下,肉眼观察结肠组织形态变化情况、结肠黏膜损伤情况等。参照 IBA 等^[18]的标准进行结肠组织学病理评分,具体见表 1。

表 1 结肠组织病理学评分标准

项目	0 分	1 分	2 分	3 分
上皮损伤	无	<5%	5%~10%	>10%
腺体损伤	无	<10%	10%~20%	>20%
杯状细胞破坏	无	轻度	中度	中度
炎细胞浸润	无	黏膜层	黏膜下层	结肠全层
溃疡深度	无	上皮层	黏膜固有层	黏膜肌层

1.10 HE 染色观察结肠组织

将取出的新鲜结肠组织置于 4%多聚甲醛中固定、石蜡包埋、HE 染色,在显微镜下观察结肠组织的结构变化、炎症情况。

1.11 TUNEL 荧光法检测大鼠结肠组织细胞凋亡情况

对结肠组织切片先增加细胞膜通透性,然后让 rTDT 和生物标记的 dTUTP 进入细胞内,在 rTDT 的辅助下 dTUTP 与核断裂的 DNA 3'-OH 结合,再用 HRP 标记的链霉亲和素与 dTUTP 上的 biotin 结合(每个链霉亲和素至少可以再结合 3 个 Biotin 分子),最后用 DAB、过氧化氢与 SP 上的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)发生氧化、环化反应,形成苯乙炔聚合物而呈现棕褐色,最终通过计

数每张切片上阳性细胞的比例来判断细胞凋亡发生情况。

1.12 ELISA 检测 NF- κ B/TNF- α 信号通路相关因子的表达

实验开始前,收集的血清样本及各试剂均置于室温平衡;试剂或样品配制时,均需充分混匀,并尽量避免起泡。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔,空白孔加样品稀释液 100 μL ,余孔分别加标准品或待测样品 100 μL 。给酶标板覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min。弃去液体,每孔加生物素化抗体工作液 100 μL (临用前 20 min 内配制,避光放置),加上覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min。弃去液体,洗板 3 次,每次浸泡 30 s,大约 350 μL /孔,甩干并在吸水纸上轻拍,将孔内液体拍干。每孔加酶结合物工作液 100 μL (临用前 20 min 内配制,避光放置),加上覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次。每孔加 TMB 90 μL ,酶标板加上覆膜 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。每孔加终止液 50 μL 终止反应,此时蓝色立转黄色。立即用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔的光密度(optical density, OD)值。

1.13 免疫组织化学检测 NF- κ B/TNF- α 信号通路相关因子的表达

组织经 75%、80%、90%、95%、100%的梯度乙醇进行脱水处理至完全透明,透明后的组织块依次经低熔点 100%石蜡(40 $^{\circ}\text{C}$)一遍、高熔点 100%石蜡(60 $^{\circ}\text{C}$)两遍浸蜡,100%石蜡纸盒内凝固完成包埋。包埋好的蜡块使用病理切片机进行切片,切好的组织片放入 40 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中进行展片,防脱玻片倾斜插入水面,使组织贴附在载玻片的合适位置,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤片 3 h。然后切片脱蜡和抗原修复,采用电陶炉进行抗原修复。将配制好的 3%过氧化氢溶液滴加于切片组织上以阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加稀释好的正常山羊血清,室温封闭 30 min,以减少非特异性染色,滴加稀释好的一抗 p65(1:100)和 Caspase-3(1:100),加完一抗后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜(15 h)。加 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。每张切片滴加新鲜配制的 DAB 显色液,染色 3~10 min。终止染色后,苏木素复染 1~2 min,氨水返蓝。梯度乙醇脱水处理后中性树胶封片,完成免疫组织化学染色。显微镜下观察和采集图像。

1.14 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态性和方差齐性时采用单因素

方差分析,不符合正态性和(或)方差齐性时采用 *Kruskal-Willis H* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芩柏加减方治疗 UC 的物质基础探索

从 TCMSMP 数据库检索获得芩柏加减方成分 1 156 个,其中党参 134 个、白术 5 个、黄芪 87 个、黄芩 143 个、黄柏 140 个、秦艽 27 个、当归 125 个、桃仁 66 个、防风 173 个、泽泻 46 个、丹参 202 个、大黄 92 个、延胡索 77 个,根据筛选条件过滤后获得 272 个相关有效成分。通过 SwissTarget Prediction 预测并经 UniProt 校对名称后,获得相关靶点 1 031 个。GSE75214 芯片分析结果以“ $P<0.05$, $|\log FC|>1$ ”筛选,获得对 UC 差异基因 848 个。将筛选后成分预测的靶点与 GSE75214 芯片差异基因统计,获得共同靶点 103 个。根据调控网络分析得知,与共同靶点相关的成分有 167 个,其中党参 13 个、白术 1 个、黄芪 13 个、黄芩 26 个、黄柏 29 个、秦艽 1 个、当归 2 个、桃仁 13 个、防风 13 个、泽泻 8 个、丹参 34 个、大黄 6 个、延胡索 37 个。对调控网络进行度值分析,芩柏加减方治疗 UC 的主要活性成分是紫花前胡素、5,7,2',6'-四羟基黄酮、黄芩苷、芹菜黄酮、去甲芍药素等,共同靶点以前列腺

素内过氧化物合酶 2、激酶插入区受体、多药耐药性蛋白、单胺氧化酶 A、基质金属蛋白酶 9 相关性较强。KEGG 富集分析显示,芩柏加减方治疗 UC 主要涉及 46 条相关通路,主要与 TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路等联系密切。

借助 DAVID 平台对芩柏加减方治疗 UC 的靶点进行 GO 与 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析显示,主要与炎症反应、对脂多糖反应、正调控胞质钙离子浓度等相关;细胞组成涉及 42 条,主要富集在细胞表面、质膜、分泌颗粒膜等;分子功能涉及 67 条,主要富集条目为跨膜受体肽链内切酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性等。KEGG 富集分析显示,主要涉及 46 条相关通路,主要与 TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路等联系密切。通过 Reactome 数据库分析发现芩柏加减方治疗 UC 主要与免疫系统、信号转导及疾病等机制相关。详见图 1—2。

2.2 芩柏加减方对 UC 大鼠疾病活跃指数 (disease activity index, DAI) 评分的影响

与正常对照组比较,经 TNBS 灌肠处理的各组大鼠 DAI 评分均升高 ($P<0.05$),提示造模成功。给药 1 d,与模型组相比,奥沙拉嗪组和芩柏加减方高、低

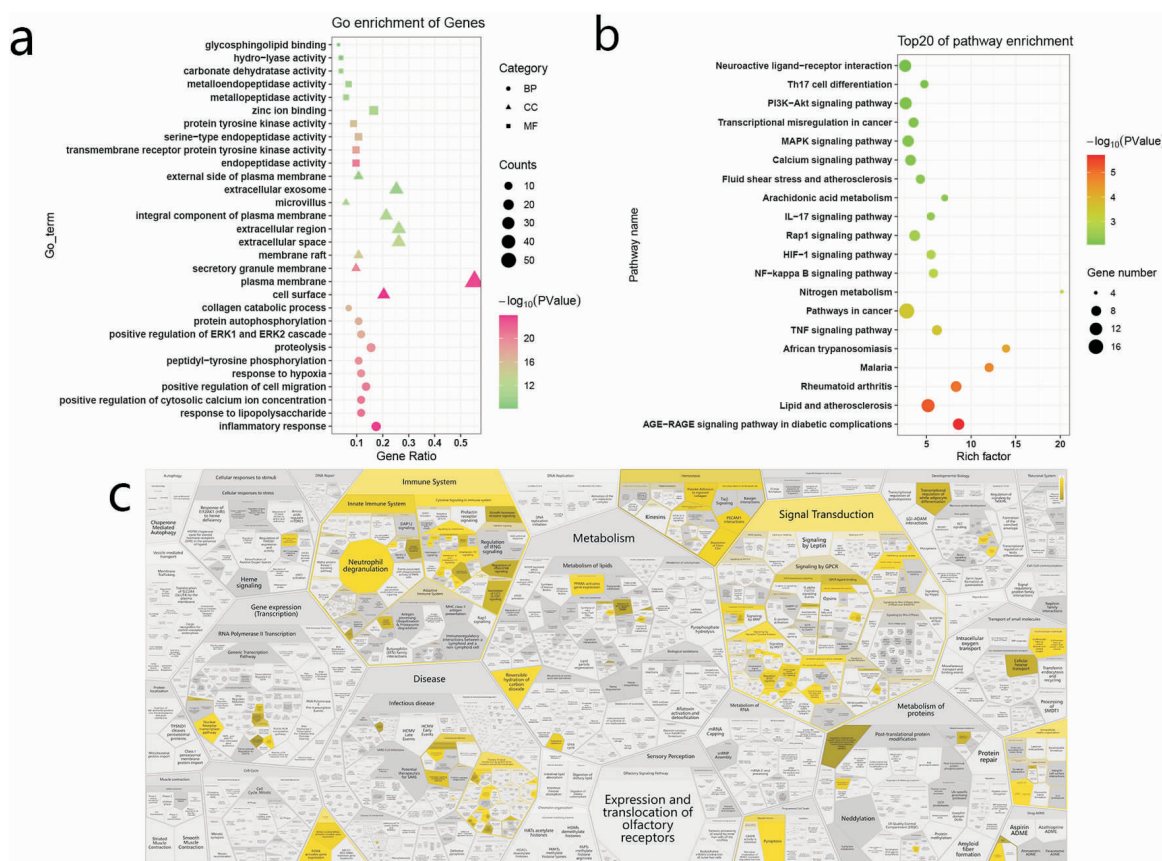


图 1 芩柏加减方治疗 UC 的作用机制分析

注:a.GO 分析;b.KEGG 通路分析;c.Reactome 机制分析。

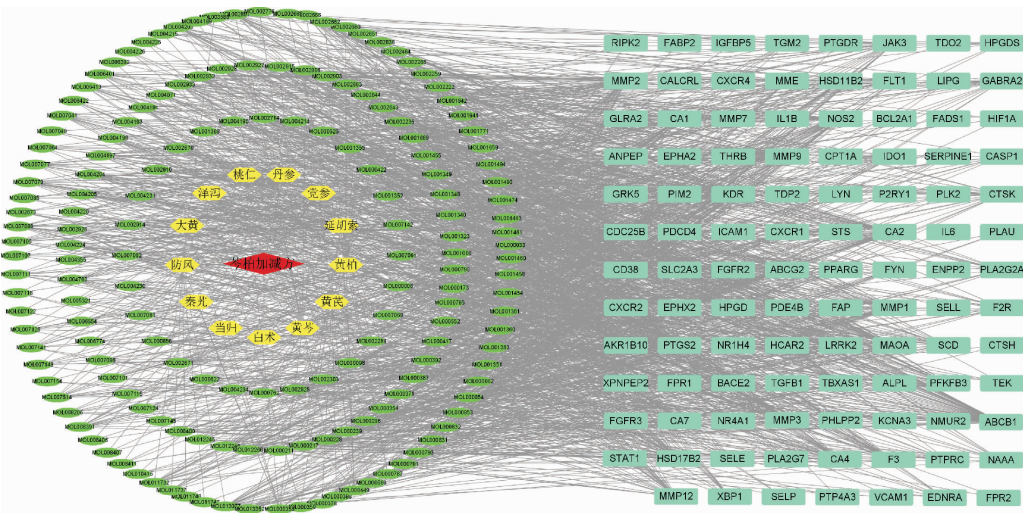


图 2 芩柏加减方-中药-成分-靶点调控网络图

剂量组 DAI 评分均无明显变化,差异无统计学意义 ($P>0.05$);给药 7 d,与模型组相比,奥沙拉嗪组 DAI 评分降低 ($P<0.05$),而芩柏加减方高、低剂量组差异无统计学意义 ($P>0.05$);给药 14 d,与模型组比较,奥沙拉嗪组和芩柏加减方高、低剂量组大鼠 DAI 评分均明显降低 ($P<0.05$)。另外,芩柏加减方高剂量时间点组内对比发现,与 1 d 相比,7 d 的 DAI 评分差异无统计学意义 ($P>0.05$),14 d 的 DAI 评分明显下降 ($P<0.05$)。详见表 2。结合结肠组织 HE 染色结果显示,模型组的结肠腺体排列紊乱,肌底膜断裂或消失,并伴有炎症性细胞浸润,隐窝脓肿形成(圆圈所示);芩柏加减方高剂量组给药 14 d,其结肠损伤病理明显减少,结肠腺体呈现纤维化再生和修复,炎症细胞浸润减少(箭头所示),与其 DAI 评分表现一致。详见图 3。

表 2 各组大鼠 DAI 评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	DAI 评分/分		
	1 d	7 d	14 d
正常对照组	1.33±0.89	1.17±0.94	1.08±0.52
模型组	9.83±1.12*	8.92±0.90*	7.42±0.90*
奥沙拉嗪组	9.67±1.44*	6.92±1.17* [△]	5.00±0.74* [△]
芩柏加减方高剂量组	9.75±0.97*	8.25±0.97*	4.58±1.51* ^{△#}
芩柏加减方低剂量组	9.50±1.09*	9.00±0.85*	5.50±1.38* [△]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与芩柏加减方高剂量组 1 d 比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 芩柏加减方对细胞凋亡的影响

给药 1 d 和给药 7 d,模型组的结肠腺体均排列紊乱,基底膜断裂或消失;给药 14 d,奥沙拉嗪组及芩柏加减方高、低剂量组的结肠腺体呈现不

同程度的纤维化再生(图 4)。给药 1 d,与正常对照组比较,经 TNBS 灌肠处理的各组大鼠凋亡指数评分均升高 ($P<0.05$);给药 7 d,与模型组相比,奥沙拉嗪组凋亡指数明显降低 ($P<0.05$),而芩柏加减方高、低剂量组凋亡指数差异无统计学意义 ($P>0.05$);给药 14 d,与模型组比较,奥沙拉嗪组及芩柏加减方高、低剂量组大鼠细胞凋亡指数均明显降低 ($P<0.05$)。另外,芩柏加减方高剂量各时间点组内对比发现,与 1 d 相比,7 d 的细胞凋亡指数差异无统计学意义 ($P>0.05$),14 d 的细胞凋亡指数明显下降 ($P<0.05$)。详见表 3。因此,后续选用给药 14 d 作为研究点进行进一步探究。

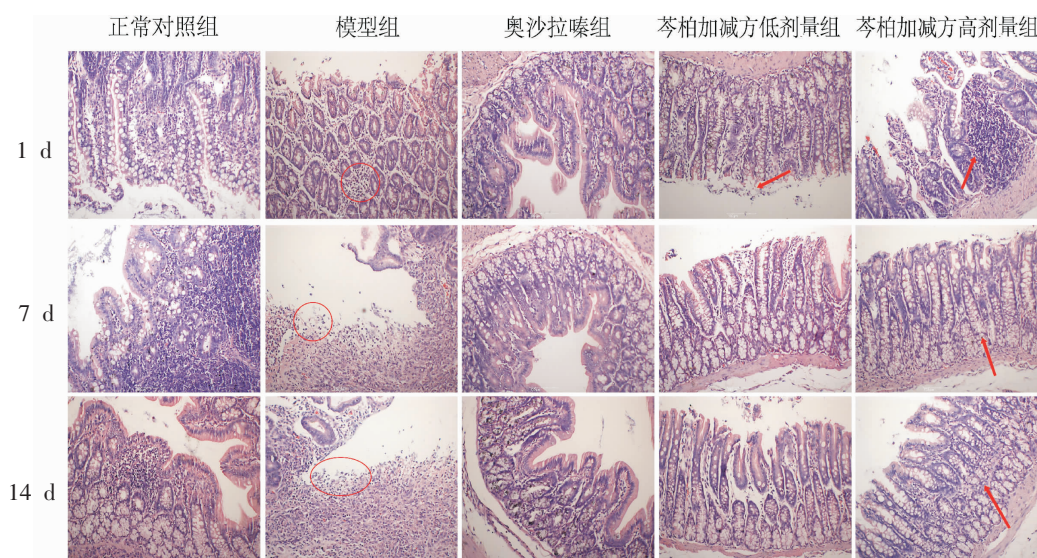
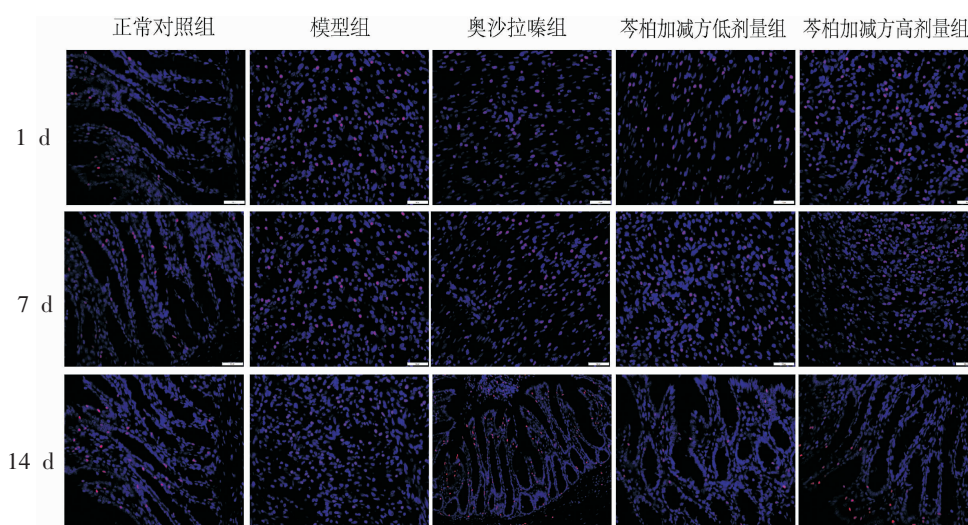
表 3 各组大鼠结肠组织细胞凋亡指数比较 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	凋亡指数/%		
	1 d	7 d	14 d
正常对照组	2.88±1.11	3.41±0.98	3.08±0.95
模型组	21.15±3.61*	19.40±1.32*	15.13±2.00*
奥沙拉嗪组	19.98±2.13*	15.02±2.82* [△]	6.68±1.34* [△]
芩柏加减方高剂量组	20.67±2.81*	19.84±3.35*	7.92±1.06* ^{△#}
芩柏加减方低剂量组	19.50±3.04*	19.50±3.03*	9.28±1.31* [△]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与芩柏加减方高剂量组 1 d 比较,[#] $P<0.05$ 。

2.4 病理检测芩柏加减方对 TNF- α 、IL-10、NF- κ B p65 和 Caspase-3 的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠结肠组织中 TNF- α 、NF- κ B p65 和 Caspase-3 含量水平均升高,而 IL-10 含量明显降低 ($P<0.05$);与模型组相比,奥沙拉嗪组及芩柏加减方高、低剂量组的 TNF- α 、NF- κ B p65 和 Caspase-3 含量明显降低,而 IL-10 含量明显升高 ($P<0.05$);与奥沙拉嗪组比较,芩柏加减方

图3 大鼠结肠组织 HE 染色结果($\times 400$)图4 大鼠结肠组织各时间点细胞凋亡 TUNEL 染色结果($\times 400$)

低剂量组的 IL-10 含量降低, Caspase-3 含量升高 ($P < 0.05$); 与芩柏加减方高剂量组比较, 芩柏加减方低剂量组的 TNF- α 、NF- κ B p65 和 Caspase-3 含量升高, IL-10 含量降低 ($P < 0.05$)。说明合适浓度的药物处理后具有一定的治疗缓解作用, 随后在血清水平进一步检测其通路相关炎症因子的变化差异。详见图 5、表 4。

2.5 血清检测芩柏加减方对 TNF- α 、IL-10、NF- κ B p65、Caspase-3 的影响

与正常对照组相比, 模型组大鼠血清中 TNF- α 、Caspase-3 和 NF- κ B p65 含量均升高, IL-10 水平明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 芩柏加减方低剂量组血清中 TNF- α 、Caspase-3 含量均降低 ($P < 0.05$), IL-10、NF- κ B p65 变化不明显, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 奥沙拉嗪组、芩柏加减方高剂量组的 TNF- α 、

Caspase-3 和 NF- κ B p65 水平相对于模型组均降低, IL-10 含量升高 ($P < 0.05$)。与奥沙拉嗪组比较, 芩柏加减方低剂量组的 IL-10 含量降低, NF- κ B p65 含量升高 ($P < 0.05$); 与芩柏加减方高剂量组比较, 芩柏加减方低剂量组的 TNF- α 、NF- κ B p65 和 Caspase-3 含量升高, IL-10 含量降低 ($P < 0.05$)。详见表 5。各细胞因子的含量水平在芩柏加减方低、高剂量之间存在一定的浓度相关性, 可知大鼠血清中 TNF- α 、Caspase3 和 NF- κ B p65 的含量水平与溃疡性炎症的发生发展呈正相关性, IL-10 作为抗炎因子则表现为负相关性, 说明高剂量的芩柏加减方在治疗缓解溃疡性结肠炎上与奥沙拉嗪具有相似的疗效, 可能是通过干预 NF- κ B p65/TNF- α 信号通路, 影响相关细胞因子 TNF- α 、IL-10、Caspase-3、NF- κ B p65 的表达发挥治疗与缓解溃疡性炎症的作用。

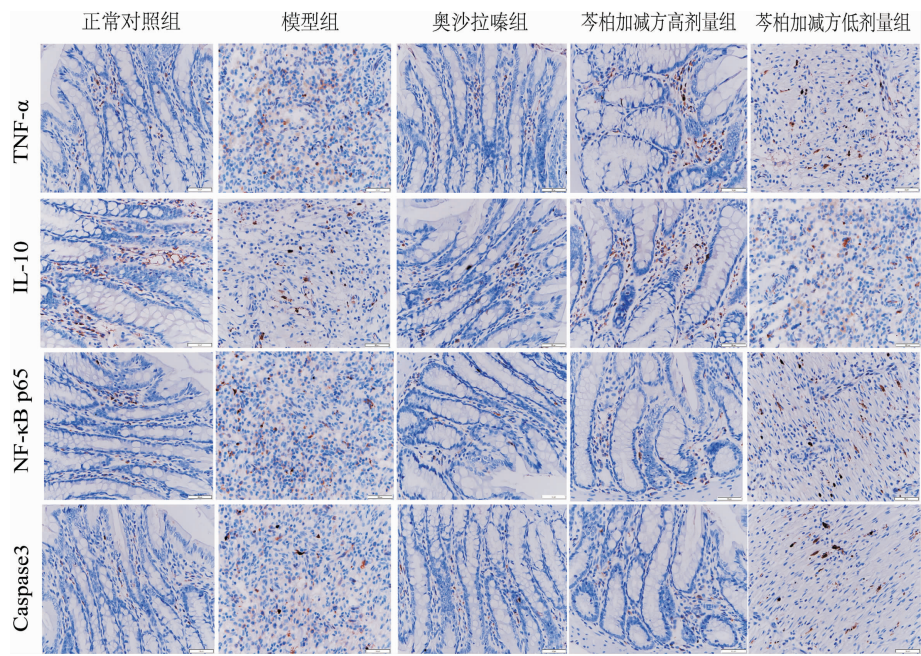


图 5 各组大鼠 TNF-α、IL-10、NF-κB p65、Caspase-3 免疫组织化学染色结果(×400)

表 4 各组大鼠结肠组织 TNF-α、IL-10、Caspase-3 和 NF-κB p65 的 OD 值比较($\bar{x}\pm s, n=12, \times 10^{-3}$)

组别	TNF-α	IL-10	NF-κB p65	Caspase-3
正常对照组	6.42±1.82	63.82±8.14	4.88±3.86	0.60±0.33
模型组	44.76±5.29*	6.32±0.97*	51.32±7.34*	6.51±1.44*
奥沙拉嗪组	11.90±3.16* [△]	47.23±4.33* [△]	23.87±2.35* [△]	1.93±0.75* [△]
芩柏加减方高剂量组	13.16±1.22* [△]	37.12±4.24* [△]	22.53±1.06* [△]	2.71±0.46* [△]
芩柏加减方低剂量组	16.82±1.37* [△] [※]	22.67±2.88* [△] [※]	24.97±3.46* [△] [※]	4.67±1.03* [△] [※]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与奥沙拉嗪组比较,* $P<0.05$;与芩柏加减方高剂量组比较,* $P<0.05$ 。

表 5 大鼠血清 TNF-α、IL-10、Caspase-3 和 NF-κB p65 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	TNF-α	IL-10	NF-κB p65	Caspase-3
正常对照组	145.88±9.96	103.67±9.04	103.63±11.51	35.47±4.61
模型组	545.71±27.09*	35.67±1.68*	262.43±25.61*	125.31±9.86*
奥沙拉嗪组	255.81±15.61* [△]	74.08±6.27* [△]	164.17±10.75* [△]	78.14±9.63* [△]
芩柏加减方高剂量组	266.39±26.26* [△]	68.50±4.82* [△]	182.56±30.25* [△]	66.72±6.58* [△]
芩柏加减方低剂量组	394.67±12.42* [△] [※]	42.93±7.06* [△] [※]	219.17±22.13* [△] [※]	89.06±6.33* [△] [※]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与奥沙拉嗪组比较,* $P<0.05$,与芩柏加减方高剂量组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

UC 属于中医学“痢疾”“便血”“肠癖”“泄泻”等范畴,为本虚标实之证,气血亏虚、脉络失养为其本,痰浊瘀胶结留滞、痹阻肠络为其标,基本病理因素为血瘀、食积、痰浊、湿热、气滞等^[19-20]。现代中医医家的临证经验及本课题组多年的临床实践均发现,UC 病机以“脾虚”为本,“湿热瘀毒”为标,治疗中遵循发时治标、平时治本的原则,着重强调“健脾益气,和中补虚”的重要性,尤其是对于 UC 慢性持续性发作患者,不应只强调清热解毒,而应注重补虚健脾^[21-22]。

因此,本课题组紧扣 UC 的本质,以“益气除湿祛瘀”立法,将湖南中医药大学第二附属医院自制方剂“复方芩柏颗粒剂”化裁成芩柏加减方。临床和动物实验都已证实,芩柏加减方对 UC 的疗效佳^[23-24]。

芩柏加减方由党参、炒白术、生黄芪、黄芩、黄柏、延胡索、当归尾、桃仁、丹参、防风、秦艽、泽泻、大黄 13 味中药组成,诸药共行健脾益气、燥湿化痰之效。现代研究认为黄芩具抗炎、抗菌、抗病毒,可抑制细菌对肠上皮细胞的侵袭,下调 UC 模型大鼠 NF-κB 的表达。另有研究表明,黄芩苷^[25-26]可对小鼠淋巴细胞中 T 淋巴细胞产生较强的抑制增生及活化作用^[27]。

黄连提取物可抑制 LPS 诱导毒血症模型大鼠的 NF- κ B 表达^[28]。研究亦发现,黄芪多糖和黄芪甲苷均能减少结肠组织炎症因子释放,修复黏膜屏障,从而对 UC 大鼠具有治疗作用^[29-30]。SHEN 等^[31]研究发现,黄芪可以显著降低 Caspase-3 蛋白的表达。网络药理学中筛选出芩柏加减方中的有效成分 β -谷甾醇和豆甾醇,能有效改善 DSS 引起的小鼠结肠炎^[32]。汉黄芩苷可能通过下调促炎、氧化因子水平,上调抑炎、抗氧化因子水平以缓解 UC 大鼠炎症、氧化损伤,促进黏膜修复^[33]。其具体机制可能与芩柏加减方调控 TNF 信号通路和 NF- κ B 信号通路有关。

NF- κ B p65/TNF- α 信号通路活化是导致 UC 发生炎症反应的关键因素^[34-35]。NF- κ B p65 作为 UC 中的主要亚基形式,其过度表达能够使腺体细胞的线粒体受到损害,破坏黏膜的生理屏障,从而加重病情^[36]。NF- κ B p65 表达的增加促进了 TNF- α 的表达。TNF- α 是一种由单核细胞产生的多功能细胞因子,在炎症反应中起促进作用,TNF- α 激活丝裂原活化蛋白激酶和 NF- κ B 通路,促进细胞分化、细胞增殖和促炎细胞因子的上调^[37]。研究发现,UC 患者血清中 TNF- α 较正常患者升高^[38]。IL-10 由 B 细胞、T 细胞和单核细胞分泌,通过减少单核细胞的抗原呈递能力来抑制 TNF- α 的产生,在黏膜免疫系统中起保护作用^[39]。TNF- α 与 Caspase 蛋白结合形成复合物,复合物聚集后迅速活化并触下游信号通路,从而诱导肠上皮细胞凋亡、促进 UC 的发生发展^[40]。而 Caspase-3 的表达也会促使炎症因子的表达,促进细胞凋亡,导致 UC 的发生^[41]。

本研究发现,网络药理学分析显示芩柏加减方主要通过 NF- κ B p65/TNF- α 信号通路发挥治疗 UC 的作用。在 UC 动物造模实验中发现,在造模后 21 d(给药 14 d)芩柏加减方组的 DAI 评分明显降低($P<0.05$),上皮细胞损伤减少,黏膜损伤减少,炎细胞浸润明显减少,说明芩柏加减方对 TNBS 诱导的 UC 大鼠有保护作用,能显著降低细胞凋亡指数。同时通过检测血清中炎症相关因子也发现:UC 模型组 TNF- α 和 IL-1 β 含量相比正常对照组显著升高,IL-10 明显降低,经 TNBS 灌肠治疗后大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量降低,IL-10 水平升高,从而发挥调节 UC 大鼠炎性细胞因子的分泌,减轻机体炎症反应,最终达到缓解 UC 的目的,其具体机制可能是通过调节 NF- κ B/TNF- α 信号通路来降低炎

症因子的分泌,减轻机体炎症反应,提高抗炎因子 IL-10 的表达,促进黏膜愈合而达到治疗效果。

综上所述,芩柏加减方对于 TNBS 诱导的实验性 UC 大鼠具有治疗作用,以高剂量效果最佳,其具体机制可能与降低 TNF- α 、Caspase-3、NF- κ B p65 的表达,防止黏膜损伤,增加 IL-10 的表达促进黏膜修复有关。

参考文献

- [1] 梁笑楠,尹凤荣,张晓岚.炎症性肠病诊断与治疗的共识意见:溃疡性结肠炎部分解读[J].临床荟萃,2018,33(11):987-990.
- [2] 沈洪,唐志鹏,唐旭东,等.消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南(基层医生版)[J].中华中医药杂志,2019,34(9):4155-4160.
- [3] LAMB C A, KENNEDY N A, RAINE T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults[J]. Gut, 2019, 68(Suppl 3): s1-s106.
- [4] KUCHARZIK T, ELLUL P, GREUTER T, et al. ECCO guidelines on the prevention, diagnosis, and management of infections in inflammatory bowel disease[J]. Journal of Crohn's & Colitis, 2021, 15(6): 879-913.
- [5] NAKASE H, UCHINO M, SHINZAKI S, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease 2020[J]. Journal of Gastroenterology, 2021, 56(6): 489-526.
- [6] 万健,张琴,梁树辉,等.溃疡性结肠炎发生异型增生危险因素的多中心长期随访研究[J].中华消化杂志,2020,40(7):461-465.
- [7] 李兴丰,赖卫强.溃疡性结肠炎患者感染幽门螺杆菌的血清炎性细胞因子水平和肠道菌群浓度分析[J].中国预防医学杂志,2020,21(9):995-998.
- [8] 冯媛,刘欣,史海涛,等.幽门螺杆菌感染对溃疡性结肠炎患者炎性细胞因子水平和肠道菌群含量的影响[J].世界临床药物,2019,40(5):334-339.
- [9] GROUP A C I W. Retrospective analysis of 515 cases of Crohn's disease hospitalization in China: Nationwide study from 1990 to 2003[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2006, 21(6): 1009-1015.
- [10] 郝丽华,周秀彦.从微生物-肠-脑轴分析焦虑、抑郁与炎症性肠病关系的进展[J].中国临床研究,2021,34(5):694-698.
- [11] ZHANG B, XIE Z D, LI B. The clinicopathologic impacts and prognostic significance of GLUT1 expression in patients with lung cancer: A meta-analysis[J]. Gene, 2019, 689: 76-83.
- [12] 胡锦涛,蒋士生,牛俊杰.芪连结肠宁对溃疡性结肠炎模型大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路及肠道菌群的影响[J].湖南中医药大学

- 学学报, 2022, 42(9): 1442–1450.
- [13] 李佃贵, 杨倩, 才艳茹, 等. 李佃贵教授中西医结合治疗溃疡性结肠炎经验[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27 (4): 244–246.
- [14] 张声生, 杨雪, 赵鲁卿, 等. 清热除湿中药灌肠方治疗溃疡性结肠炎近期疗效的观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(6): 401–405.
- [15] 刘朝霞, 张诗嘉, 冯媛君, 等. 谢晶日教授从“积”论治溃疡性结肠炎的经验启发[J]. 中国中医急症, 2021, 30(9): 1660–1663.
- [16] 陆文洪, 莫黎, 王真权, 等. 网络药理学结合实验验证探究芩柏四物合剂对坏死性筋膜炎术后小鼠炎性反应及高凝状态的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 465–472.
- [17] 毛叶勤, 陈琳, 吴育, 等. 蒲公英水提物对大鼠溃疡性结肠炎的作用[J]. 中成药, 2022, 44(3): 752–757.
- [18] IBA Y, SUGIMOTO Y, KAMEI C, et al. Possible role of mucosal mast cells in the recovery process of colitis induced by dextran sulfate sodium in rats[J]. International Immunopharmacology, 2003, 3(4): 485–491.
- [19] 付艳伟. 溃疡性结肠炎中医药干预治疗研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(7): 1402–1405.
- [20] 张慧, 张云松, 姜璐, 等. 以“络以通为用”为指导探讨溃疡性结肠炎的诊疗[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44 (11): 1044–1048.
- [21] 曹云, 郭志玲, 何莹, 等. 田德禄论治溃疡性结肠炎经验[J]. 北京中医药, 2020, 39(1): 23–26.
- [22] 陆为民, 周晓波, 徐丹华. 国医大师徐景藩教授论治溃疡性结肠炎的经验[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 124–126.
- [23] 陆文洪, 罗雯鹏, 肖戈. 芩柏加减方治疗溃疡性结肠炎效果及安全性观察[J]. 世界中医药, 2022, 17(8): 1110–1113.
- [24] 陆文洪, 罗雯鹏, 王真权. 复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 p-p38MAPK、CK2 表达的影响[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(4): 136–137.
- [25] 刘洁, 史红健, 熊雨, 等. 黄芩苷通过 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41 (8): 1154–1159.
- [26] TSOU L K, LARA-TEJERO M, ROSEFIGURA J, et al. Antibacterial flavonoids from medicinal plants covalently inactivate type III protein secretion substrates[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(7): 2209–2218.
- [27] 曾光, 梁清华, 游万辉, 等. 黄芩苷对 T 淋巴细胞增殖与活化的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(6): 20–22.
- [28] CHOI Y Y, KIM M H, CHO I H, et al. Inhibitory effect of Coptis chinensis on inflammation in LPS-induced endotoxemia [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 149(2): 506–512.
- [29] 臧凯宏, 吴建军, 段海婧, 等. 黄芪甲苷 IV 对溃疡性结肠炎大鼠的作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(1): 48–51.
- [30] 臧凯宏, 吴建军, 秦红岩, 等. 黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道黏膜屏障的影响[J]. 中药材, 2017, 40(1): 208–211.
- [31] SHEN J, CHENG J Z, ZHU S G, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis[J]. International Immunopharmacology, 2019, 73: 193–200.
- [32] 冯思敏, 宁可, 邵平, 等. β -谷甾醇和豆甾醇对小鼠急性结肠炎的治疗作用研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(12): 80–86, 94.
- [33] 张霞, 杜文泽, 赵汉清, 等. 汉黄芩苷对溃疡性结肠炎大鼠促炎因子、氧化应激标志物水平的影响及黏膜修复作用[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(12): 2994–2998.
- [34] YAO D B, DONG M, DAI C L, et al. Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2019, 25(10): 1595–1602.
- [35] LIU B H, PIAO X H, NIU W, et al. Kuijieyuan Decoction improved intestinal barrier injury of ulcerative colitis by affecting TLR4-dependent PI3K/AKT/NF- κ B oxidative and inflammatory signaling and gut microbiota[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 1036.
- [36] 黄循铷, 王承党, 王瑞幸, 等. 溃疡性结肠炎小鼠肠道通透性改变与 TNF- α 及 NF- κ B P65 的关系[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(2): 112–115, 193.
- [37] PEDERSEN J, COSKUN M, SOENDERGAARD C, et al. Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(1): 64–77.
- [38] 易蕊, 常娟, 刘晓艳, 等. TNF- α 、IL-6 及 IL-8 在不同程度溃疡性结肠炎患者血清中的表达及意义[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(14): 2641–2644.
- [39] WANG S X, WANG J X, MA R, et al. IL-10 enhances T cell survival and is associated with faster relapse in patients with inactive ulcerative colitis[J]. Molecular Immunology, 2020, 121: 92–98.
- [40] LEHLE A S, FARIN H F, MARQUARDT B, et al. Intestinal inflammation and dysregulated immunity in patients with inherited caspase-8 deficiency [J]. Gastroenterology, 2019, 156(1): 275–278.
- [41] RUTKOWSKI D T, KAUFMAN R J. A trip to the ER: Coping with stress[J]. Trends in Cell Biology, 2004, 14(1): 20–28.