DOI:10.16016/j.1000-5404.201910144

复方缓溃乐混悬剂对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及机制

阿依加玛力·沙依提[1],卡思木江·阿西木江[1],许晨波[1],希林古丽·吾守尔[2],吴桂霞[3],纳菲沙·卡德尔[2],库热西·玉努斯[4] 830011 乌鲁木齐,新疆医科大学:基础医学院生物化学与分子生物学教研室[1],基础医学院生物学教研室[2],基础医学院生理学教研室[3],维吾尔医学院[4]

[**摘要**] **目的** 探讨复方缓溃乐混悬剂对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)大鼠结肠组织细胞因子 IL-6、IL-17、IL-10 及 TGF-β1 表达的影响及其治疗 UC 的作用机制。**方法** 选取 50 只 SPF 级 Wistar 雄性大鼠,TNBS/乙醇复合法建立 UC 模型并鉴定后,随机数字表法将大鼠随机分为正常组、阴性对照组、复方缓溃乐干预组(HKL 组)及 5-氨基水杨酸干预组(5-ASA 组)。以相应药物干预 14 d,进行结肠组织损伤指数(colonic injury index,CMDI)及病理学评分、HE 染色观察形态学变化、RT-qPCR 和 ELISA 方法分别检测 IL-6、IL-17、IL-10、TGF-β1 mRNA 和蛋白质的表达水平。**结果** 与正常组相比,阴性对照组大鼠 CMDI 及病理学评分分级显著增高($P<0.05$);药物干预后,HKL 及 5-ASA 组 CMDI 及病理学评分分级较阴性对照组均显著降低($P<0.05$)。分子实验结果显示:与正常组相比,阴性对照组大鼠 IL-6、IL-17、IL-10 mRNA 和蛋白质的表达水平均明显上调($P<0.05$),TGF-β1 mRNA 的表达水平有下调趋势,但差异无统计学意义,而其蛋白质的表达水平明显下调($P<0.05$);与阴性对照组相比,HKL 组和 5-ASA 组中 IL-6、IL-17 mRNA 和蛋白质以及 IL-10 蛋白质的表达水平均明显下调($P<0.05$),TGF-β1 mRNA 的表达水平明显上调($P<0.05$),而 IL-10 mRNA 和 TGF-β1 蛋白质的表达水平只有在 HKL 组中有明显差异($P<0.05$)。HKL 组和 5-ASA 组相比各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** HKL 可以有效改善 UC 大鼠的一般症状及组织损伤,具有较好的治疗作用,其作用机制可能与促炎因子 IL-6、IL-17 的下调和抑炎因子 TGF-β1 的上调有关。

[**关键词**] 复方缓溃乐混悬剂;溃疡性结肠炎;促炎因子;抑炎因子
[**中图法分类号**] R285.5; R392.11; R574.62 [**文献标志码**] A

Effect of Compound Huankuile Suspension on ulcerative colitis in rats and the therapeutic mechanism

SHAYITI Ayijiamali[1], AXIMUJIANG Kasimujiang[1], XU Chenbo[1], WUXUER Xilinguli[2], WU Guixia[3], KADEER Nafeisha[2], YUNUSI Kurexi[4] [1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2]Department of Biology, [3]Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences; [4]Uyghur Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, 830011, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Huankuile (HKL) suspension, a compound traditional Chinese herbal medicinal preparation, for treating ulcerative colitis (UC) in rats and explore its therapeutic mechanism. **Methods** Fifty male Wistar rats were randomized into normal control group, UC model group, HKL suspension intervention group, and 5-amino acid (5-ASA) intervention group. Except for those in the normal control group, all the rats were subjected to colonic enema with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and ethanol to induce UC, followed by drug treatment for 14 d. The colonic injury

[**基金项目**] 新疆维吾尔自治区"十三五"重点学科建设项目(高原学科,学科代码:1001)
[**通信作者**] 库热西·玉努斯,E-mail:Kurax8824@sina.com

index (CMDI) and pathological scores of the colon tissues were assessed, and the histopathological changes in the colon was observed with HE staining. The mRNA and protein expression levels of interleukin-6 (IL-6), IL-17, IL-10, and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in the colon tissues were detected using real-time PCR and ELISA. **Results** Compared with those in the normal control group, the rats in the UC model group had markedly higher CMDI and pathological scores in the colon tissues ($P<0.05$), which were significantly reduced by intervention with HKL and 5-ASA ($P<0.05$). The rats with US showed significantly increased expression of IL-6, IL-17, and IL-10 at both mRNA and protein levels in the colon tissue ($P<0.05$) without significant changes in TGF-β1 mRNA expression but with significantly decreased TGF-β1 protein expression ($P<0.05$). Treatment with HKL and 5-ASA obviously lowered the mRNA and protein level of IL-6 and IL-17 and the protein expression of IL-10 ($P<0.05$) and increased the expression level of TGF-β1 mRNA ($P<0.05$) in the colon tissue of the rats with UC; but only treatment with HKL resulted in significant changes in the expression levels of IL-10 mRNA and TGF-β1 protein in the rats with UC ($P<0.05$). HKL and 5-ASA showed no significant differences in their therapeutic effects on UC or in their effects on the expressions of the inflammatory factors ($P>0.05$). **Conclusion** HKL can effectively improve the symptoms and colonic injury in rats with TNBS-induced UC possibly by down-regulating the pro-inflammatory factors IL-6 and IL-17 and up-regulating the anti-inflammatory factor TGF-β1.

[**Key words**] Compound Huankuile Suspension; ulcerative colitis; pro-inflammatory factors; anti-inflammatory factors

Supported by the Key Discipline Construction Project in the "Thirteenth Five-Year Plan" of Xinjiang Uygur Autonomous Region (1001). Corresponding author: YUNUSI Kurexi, E-mail: Kurax8824@sina.com

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是免疫介导的胃肠道炎症性疾病[1]。近年来其发病率在全球呈逐年上升趋势,且与结直肠癌的发病关系密切,严重危害人类健康[2]。UC 的发病机制涉及遗传易感性、免疫、感染、肠道菌群改变等方面,其中免疫调节失调是其发病的首要原因[3-4]。而 T 细胞所分泌的细胞因子是免疫调节的主要效应因子,可以促进免疫细胞之间的相互作用,刺激抗原特异性效应细胞的增殖[5]。当免疫调节紊乱持续存在时,细胞因子可直接或间接影响靶细胞进一步导致炎症级联的放大和局部炎症介质对组织的损伤[6-7],引起局部或全身性炎症反应。目前,促炎和抗炎细胞因子在启动、介导、维持和控制肠道炎症中受到了广泛的关注[8]。研究显示,Th17 细胞存在于包括大肠和小肠在内的所有肠段[9],其分泌的细胞因子 IL-6、IL-17 在肠道免疫应答和炎症过程中发挥重要作用[10],且与 UC 的发病密切相关。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)可通过分泌和调节抗炎细胞因子如 IL-10 和 TGF-β1,抑制炎症反应的级联并维持肠道免疫反应的平衡[11],为目前 UC 研究的热点。

随着 UC 发病机制及治疗研究的深入,发现了一些新的药物和疗法,旨在寻找或研发毒副作用较小而效果肯定的药物。研究表明,没食子具有消炎、抗腐烂、除菌、止血等功效[12]。本课题组在前期的研究中为了进一步提升药物对 UC 的治疗效果,对没食子单用药物进行了改良而添加了具有抗炎、抗氧化等效果的其他中药材,制备了复方缓溃乐混悬剂(huankuile, HKL),然而 HKL 对 UC 的治疗作用及机制尚不清楚。基于此,本研究通过 HKL 干预 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的 UC 模型大鼠,观察 HKL 对 UC 的疗效,同时检测 Th17/Treg 细胞相关细胞因子 IL-6、IL-17、IL-10 及 TGF-β1 表达的变化,初步探讨 HKL 治疗 UC 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、实验试剂、仪器

1.1.1 实验动物 选用SPF 级 Wistar 雄性大鼠50 只,体质量(220±20)g,购自新疆医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(新)2016-0003。

1.1.2 实验试剂及药物 TNBS 购自美国 Sigma 公司;大鼠结肠组织 ELISA 试剂盒购自武汉基因美公司;TRIzol RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司;核

酸染料 Golden View™购自北京博迈德基因技术有限公司;Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒购自美国 Therom 公司;SYBR© Green Real-time PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;引物由上海生工合成;HKL 相关药材购自新疆维吾尔医医院;5-氨基水杨酸粉剂购自北京索莱宝公司。

1.1.3 仪器 -20 ℃低温冰箱购自中国海尔公司,全能型凝胶成像分析仪及梯度 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,ABI 7500 QuantStudio™Real-Time PCR 仪购自美国 ABI 公司,低温离心机购自美国 ePPendorf 公司,荧光倒置显微镜购自德国莱卡公司,酶标仪购自美国 Thermo 公司,超声粉碎匀浆机购自美国 PRO 公司。

1.2 UC 大鼠模型的建立及分组

将 50 只 8~10 周龄的 SPF 级 Wistar 雄性大鼠按随机数字表法分为正常组(n=12)和 UC 组(n=38)。参照文献[1,13]用 TNBS/乙醇灌肠建立 UC 大鼠模型,将 5%的 TNBS 溶入等体积 50%的无水乙醇中,缓慢注入 UC 组大鼠结肠,正常组注入相应体积的 0.9%氯化钠溶液灌肠,造模结束后将大鼠放入清洁笼内,待其自行清醒,自由进食饮水。造模后第 2 天,从正常组和 UC 组分别随机选取 2 只大鼠,通过大鼠的一般状况及结肠组织病理学变化,综合鉴定 UC 模型是否构建成功。再将 UC 组大鼠按随机数字表法随机分为阴性对照组(n=12)、HKL 组(n=12)、5-ASA 组(n=12,该组为阳性对照)。

1.3 药物的制备及干预

HKL:称取没食子、黄连、石榴花、琥珀、天竺黄等 8 种药材进行粉碎,按照不同比例混合备用;用车前草和温桲子浸泡在玫瑰花露中,准备药物提取液,将备用的药材粉末混合物以 0.18 g/mL 溶解在已准备好的玫瑰花露过滤液中,大鼠一次给药剂量为 1 mL/100 g。药物浓度根据前期预实验确定:高浓度 1.8 g/kg;中浓度 0.9 g/kg;低浓度 0.45 g/kg。组织学评分参照文献[14]制定的标准,根据结肠炎症程度、病变深度、隐窝破坏、病变范围进行评分,高浓度治疗效果优于中、低浓度,且从大鼠的存活数量上也能显示高剂量对大鼠的恢复存在优势。因此,本实验选取高浓度 1.8 g/kg,即 0.36 g/200 g 作为药物治疗浓度。

给药方法:①HKL 组(n=12):用 HKL 灌胃给药 1 mL/100 g 大鼠;②5-ASA 组(n=12),将 5 g 的 5-ASA 粉末溶解在 250 mL 0.9%的生理盐水中,即 20 mg/mL,灌胃给药 1 mL/200 g 大鼠;③阴性对照组(n=12)给予与 HKL 等体积的生理盐水;正常组用生理盐水灌胃干预。各组均从造模第 3 天开始连续相应干预 14 d,2 次/d;其余饲养条件与正常组一致。

1.4 结肠组织大体形态观察、损伤指数评分及 HE 染色

将隔夜禁食的大鼠次日用 10%的水合氯醛腹腔麻醉,分离取出距离肛门 8 cm 处的结肠组织,沿肠系膜纵形剪开肠腔,用预冷好的生理盐水迅速冲洗干净,吸干水分,展平观察,参照文献[15]评价结肠组织损伤指数(colonic injury index,CMDI)。0 分:正常无损伤;1 分:结肠轻度充血水肿;2 分:结肠明显水肿,粗糙呈米粒状无溃疡;3 分:形成直径约 0~1 cm 较小溃疡灶;4 分:较大溃疡,直径约 1~2 cm,与肠管和周边脏器无粘连;5 分:肠腔增厚,溃疡灶>2 cm,与附近脏器粘连严重。随后将组织纵切成两半,一半置于 4%的多聚甲醛溶液中固定,行常规石蜡包埋,取 4 μm 组织切片行 HE 染色,镜下观察组织形态,并由病理科专业人员参考文献[14]盲法阅片,评分标准见表 1。组织病理学评分=(炎细胞浸润+炎细胞浸润深度+溃疡深度)/3。评分越高表明损伤程度越明显。

表 1 结肠组织病理学评分标准

病变类型	病变程度	病变分值
炎细胞浸润	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
炎细胞浸润深度	无	0
	黏膜层	1
	黏膜下层	2
	结肠全层	3
溃疡深度	无	0
	上皮	1
	黏膜固有层	2
	黏膜肌层	3

1.5 RT-qPCR 检测结肠组织 IL-6、IL-17、IL-10 及 TGF-β1 mRNA 的表达水平

匀浆机充分研磨大鼠结肠组织,加入 1 mL TRIzol,采用氯仿异丙醇方法提取结肠组织总 RNA,用 NanoDrop 超微分光光度计测定 RNA 样品浓度和 260 nm/280 nm,并经 Bio-Rad 凝胶成像仪鉴定后参照 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒取 1 μg RNA 反转录成 cDNA。在 GenBank 数据库中查询大鼠 IL-6、IL-17、IL-10、TGF-β1 mRNA 序列,利用 IDT 引物设计网站设计引物,并由上海生工合成,引物序列见表 2。最后在 ABI 7500(QuantStudio™ Real-Time PCR System)系统下取 2 μL cDNA 进行 PCR 扩增。预变性 95 ℃ 30 s,变性 95 ℃ 5 s,退火 30 s,延伸 72 ℃ 34 s,共 40 个

循环,保持4 ℃。

1.6 ELISA检测结肠组织IL-6、IL-17、IL-10及TGF-β1蛋白的表达

切割标本后称量,加入一定量的PBS(pH=7.4),保持2~8 ℃。用匀浆机将标本充分研碎,2 500离心20 min,收集上清。严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,Th17细胞相关细胞因子IL-6(cat. No. JYM0646Ra)、IL-17(cat. no. JYM0480Ra)、Treg细胞相关细胞因子IL-10(cat. no. JYM0651Ra)、TGF-β1(cat. no. JYM0123Ra),加完终止液并在15 min内用酶标仪在450 nm波长处测定光密度值[D(450)],根据标准品已知的浓度及所对应测定的D(450)值绘制标准曲线及直线回归方程,将待测样品的D(450)值代入回归方程中计算出待测样品的浓度。

表2 RT-qPCR引物(针对mRNA)

基因	引物序列(5′→3′)	扩增产物长度/bp	退火温度/℃
IL-6	上游:GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA		
	下游:TTAGGAGAGCATTGGAAGTTGG	109	60 ℃
IL-17	上游:GCAACAATTCCTGGCGTTAC		
	下游:GTATTCCGTCTCCTTGGTTCAG	120	62 ℃
IL-10	上游:AGCTGAAGACCCTCTGGATA		
	下游:TGGCCTTGTAGACACCTTTG	129	60 ℃
TGF-β1	上游:GCAACAATTCCTGGCGTTAC		
	下游:GTATTCCGTCTCCTTGGTTCAG	120	62 ℃
β-actin	上游:CTTCCTTCCTGGGTATGGAATC		
	下游:CTGTGTTGGCATAGAGGTCTT	105	62 ℃

1.7 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD法。病理学评分分级多组比较采用非参数检验Kruskal-Wallis H检验,两组间比较用两独立样本的Mann-Whitney U检验。

2 结果

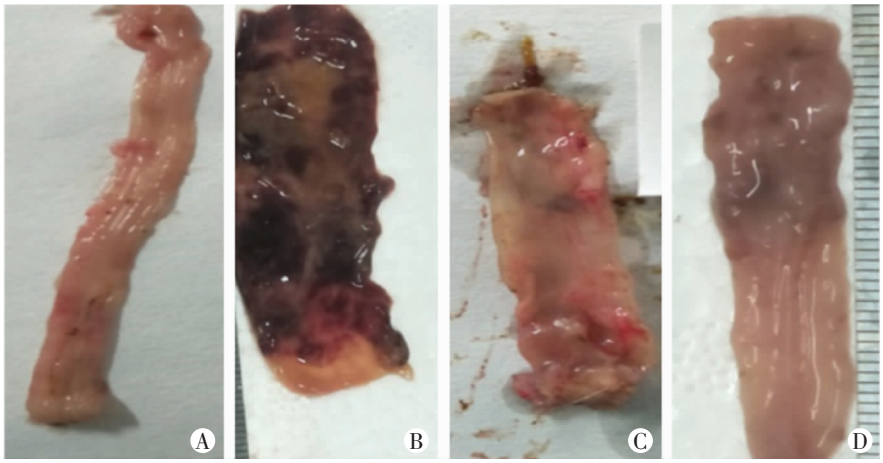
2.1 大鼠一般状态

一般症状:14 d的干预过程中,正常组大鼠饮食水量、活动度、毛发、体温均正常,无腹泻便血,体质量逐渐增加;阴性对照组、HKL组及5-ASA组大鼠从造模后第2天开始饮食饮水量明显减少,逐渐出现不同程度的腹泻以及便血、拱背、毛发稀疏不洁、消瘦、虚弱、懒动、体温降低等症状。相应药物治疗的第5天开始,HKL和5-ASA组大鼠以上情况均有不同程度的改善。

2.2 结肠组织大体形态变化及损伤评分

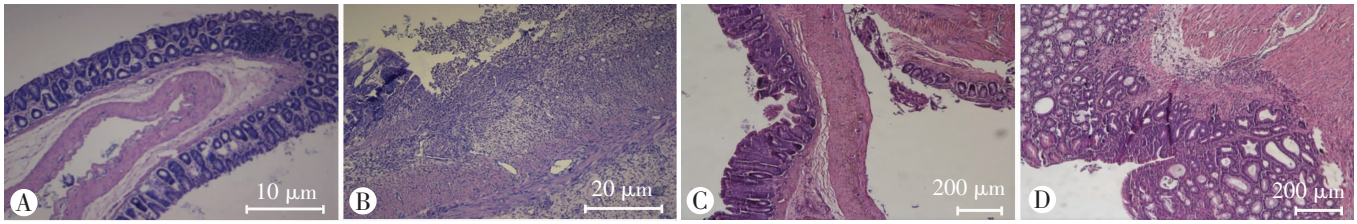
正常组大鼠结肠组织表面光滑、无出血、炎性水肿、渗出及增生;阴性对照组大鼠结肠表现为凹凸不平、结肠明显缩短、肠壁增厚、水肿、坏死、形成较大溃疡、颜色发黑、有糜烂与肠粘连(图1)。结肠组织损伤(CMDI)评分结果显示,阴性对照组CMDI评分为(4.00±0.75),显著高于正常组(0.00±0.00,$Z=-3.626$,$P<0.01$)。

与阴性对照组相比,HKL组和5-ASA组大鼠的结肠炎症明显改善,结肠表面较光滑,纹理较清晰,无粘连,个别大鼠结肠组织轻度至中度水肿、增生及糜烂



A:正常组;B:阴性对照组;C:HKL组;D:5-ASA组

图1 各组大鼠结肠组织大体形态变化



A:正常组;B:阴性对照组;C:HKL 组;D:5-ASA 组

图 2 各组大鼠结肠组织病理学变化

(图 1)。HKL 组和 5-ASA 组 CMDI 评分分别为(2.25±0.70)、(2.50±0.53)。CMDI 评分阴性对照组>5-ASA 组>HKL 组,三组间比较差异有统计学意义($\chi^2=13.657$, $P<0.01$)。进一步组间多重分析显示,HKL 组和 5-ASA 组 CMDI 评分均较阴性对照组显著降低($Z=-3.142$, $P=0.002$; $Z=-3.070$, $P=0.002$);HKL 组与 5-ASA 组比较差异无统计学意义($Z=-0.707$, $P=0.480$)。

2.3 组织病理学观察

正常组大鼠结肠黏膜腺体排列规则,隐窝结构正常,无炎性细胞浸润,未见溃疡及糜烂。阴性对照组大鼠结肠黏膜充血水肿,不同程度的腺体结构消失,大面积的黏膜坏死脱落形成的溃疡深达肌层,黏膜及黏膜下层可见大量的炎性细胞浸润,主要为淋巴细胞和中性粒细胞,表层可见纤维素样渗出物(图 2)。组织病理学(His)评分显示,阴性对照组的评分为(2.50±0.59),显著高于正常组(0.08±0.29, $Z=-3.522$, $P<0.01$)。

与阴性对照组相比,HKL 组和 5-ASA 组大鼠结肠黏膜上皮结构破坏程度减轻,腺体排列较规则,黏膜下可见轻度至中度炎细胞浸润。个别大鼠结肠可见出血点、糜烂及溃疡面,主要累及黏膜及黏膜下层,肌层无明显改变(图 2)。His 评分结果显示,HKL 组和 5-ASA 组评分分别为(1.30±0.70)、(1.70±0.57);阴性对照组>5-ASA 组>HKL 组,三组比较差异有统计学意义($\chi^2=9.428$, $P<0.01$)。进一步组间多重分析显示,HKL 组及 5-ASA 组 His 评分均较阴性对照组显著降低($Z=-2.704$, $P=0.007$; $Z=-2.197$, $P=0.028$);HKL 组与 5-ASA 组比较差异无统计学意义($Z=-1.447$, $P=0.148$)。

2.4 qRT-PCR 结果

与正常组比较,阴性对照组大鼠结肠组织 IL-6、IL-17、IL-10 mRNA 的表达水平均明显上调($P<0.05$),TGF-β1 mRNA 的表达水平有下调趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);与阴性对照组比较,HKL 组和 5-ASA 组中 IL-6、IL-17 mRNA 的表达水平明显下调,TGF-β1 mRNA 的表达水平明显上调,IL-10 mRNA 的表达水平在 HKL 组中明显下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。HKL 组和 5-ASA 组各指标差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠结肠组织细胞因子 mRNA 相对表达水平

($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6	IL-17	IL-10	TGF-β1
正常组	1.00±0.28	1.00±0.42	1.00±0.28	1.00±0.31
阴性对照组	2.37±0.74[a]	4.82±2.74[a]	2.45±0.91[a]	0.43±0.20
HKL 组	1.39±0.38[b]	1.91±1.13[b]	1.54±0.56[b]	1.22±0.65[b]
5-ASA 组	1.49±0.64[b]	1.60±1.25[b]	2.21±0.76[b]	1.24±0.62[b]

a: $P<0.05$,与正常组比较;b: $P<0.05$,与阴性对照组比较

2.5 ELISA 结果

与正常组比较,阴性对照组大鼠结肠组织中 IL-6、IL-17、IL-10 蛋白质的表达水平均明显上调,TGF-β1 蛋白质的表达水平明显下调,差异均有统计学意义($P<0.05$);与阴性对照组比较,HKL 组和 5-ASA 组中 IL-6、IL-17、IL-10 蛋白质的表达水平明显下调,TGF-β1 蛋白质的表达水平在 HKL 组中明显上调,且差异均有统计学意义($P<0.05$);HKL 组和 5-ASA 组各指标差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠结肠组织细胞因子蛋白表达水平

(pg/mL, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6	IL-17	IL-10	TGF-β1
正常组	16.01±2.52	25.74±2.94	12.40±1.85	42.35±5.00
阴性对照组	29.36±3.34[a]	45.76±4.97[a]	19.86±2.74[a]	28.02±2.54[a]
HKL 组	16.70±4.21[b]	26.23±3.20[b]	15.56±1.08[ab]	35.55±3.64[ab]
5-ASA 组	17.48±2.39[b]	27.90±2.89[b]	15.68±1.72[ab]	32.18±3.02[a]

a: $P<0.05$,与正常组比较;b: $P<0.05$,与阴性对照组比较

3 讨论

UC 是一种难治性的慢性肠道免疫性疾病,其发病机制主要与宿主的肠黏膜免疫功能障碍、遗传易感性、共生的肠道菌群紊乱等有关[16-17]。研究发现,细胞因子是肠道炎症中适应性免疫反应的关键介质[18],参与免疫反应和炎症过程。细胞因子间的失衡可以促进免疫细胞间的相互作用,刺激抗原特异性效应细胞的增殖,并引起局部或全身炎症反应[19]。因此,细胞因子平衡被紊乱认为是 UC 发生肠道非特异性炎症反应的关键环节[20],而针对细胞因子已成为治疗 UC 的新策略。

IL-6 是由肠黏膜固有层 T 细胞产生的、可以调节免疫反应及多种细胞增殖与分化的一种细胞因子[12],它的过度表达会使中性粒细胞浸润到炎症部位。小鼠体内外实验证实,IL-6 与低浓度的 TGF-β1 共同诱导初始 CD4+T 细胞分化为 Th17 细胞[21],分泌 IL-17、IL-6 等具有强烈促炎反应活性的炎症细胞因子,促进自身免疫和炎症的发生[22]。而初始 CD4+T 细胞在高浓度 TGF-β1 单独诱导下分化为 Treg 细胞,Treg 细胞通过分泌和调节细胞因子 TGF-β1 和 IL-10 抑制炎症反应级联并维持肠道免疫应答的平衡[23]。其中 IL-10 是细胞免疫反应的负性调节因子,能够下调 IL-6 等促炎因子的转录和分泌,抑制抗原提呈,从而抑制 T 细胞介导的免疫反应,在维持肠道上皮完整性中发挥重要作用[24-25]。由此可见,IL-6、IL-17、IL-10 及 TGF-β1 的交互作用,从而维持抗炎与促炎细胞因子之间的平衡。因此,上述 4 种细胞因子的异常分泌在肠道黏膜损伤及 UC 的发生、发展中至关重要,并可能为药物作用的重要靶点。

本研究中动物一般状态、结肠组织大体形态、CMDI 评分、病理学评分及 HE 染色结果均显示,HKL 对大鼠 UC 具有较好的治疗效果。分子实验结果显示,TNBS 诱导的 UC 大鼠结肠组织中 IL-6、IL-17 mRNA 和蛋白质的表达水平均明显上调,TGF-β1 蛋白质的表达水平明显下调而其 mRNA 的表达水平有下调趋势,与文献[26-27]报道一致。提示 UC 大鼠结肠组织中 IL-6 与低浓度的 TGF-β1 共同作用促进幼稚 T 淋巴细胞偏向 Th17 细胞分化,进而上调下游的促炎细胞因子 IL-6、IL-17 的分泌。随着 Th17 细胞的分化发育,Treg 细胞的分化发育被抑制,减少 TGF-β1 的分泌,细胞因子间平衡受到破坏,最终可能导致 UC 的发生。此外,本研究发现 UC 大鼠结肠组织 IL-10 mRNA 的表达水平上调,与文献[2,28]结果一致,重度肠道炎症部位 IL-10 mRNA 表达高于低炎症部位[29],且与 UC 的严重程度亦密切相关,活动期明显高于缓解期[30]。同时,本实验中 IL-10 蛋白质的表达水平也上调,表明在该模型中 IL-10 的转录活性增强,促进 mRNA 的表达,随着 mRNA 的表达升高其蛋白质的表达水平也相应增加。相关研究显示,UC 患者高水平的 IL-10 也可能促进浆细胞的分化,促使 UC 自身抗体的产生[30],提示 IL-10 在 UC 中起着多重而复杂的作用。因此,本模型中 IL-10 表达的上调可能进一步引起了细胞因子平衡紊乱,加速肠道非特异性炎症的发生。经 HKL 干预后发现,HKL 能够有效降低 TNBS 诱导的 UC 大鼠结肠组织促炎因子 IL-6、IL-17 mRNA 和蛋白质的表达,并提高抗炎因子 TGF-β1 mRNA 和蛋白质的表达,同时 HKL 可以降低 UC 大鼠结肠组织 IL-10 的过度分泌,缓解细胞因子平衡紊乱所导致的恶性循环,恢复细胞因子之间的平衡状态,促进 UC 大鼠结肠黏膜组织的愈合。

综上所述,复方缓溃乐混悬剂对大鼠 UC 具有较好的疗效,在此基础上,应继续研究 HKL 对 IL-6、IL-17、IL-10 及 TGF-β1 等与其相关 T 细胞亚群的变化以及对上游信号转导通路的影响,进一步深入探究并新药研发。

参考文献:

[1] LI Q L, SHAN Q Y, SANG X N, *et al*. Total glycosides of peony protects against inflammatory bowel disease by regulating IL-23/IL-17 axis and Th17/treg balance[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(1): 177-201. DOI: 10.1142/S0192415X19500095.

[2] LUO S, WEN R Y, WANG Q, *et al*. Rhubarb peony decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gutMicrobiota to restoring Th17/treg balance[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231: 39-49. DOI: 10.1016/j.jep.2018.08.033.

[3] TATIYA-APHIRADEE N, CHATUPHONPRASERT W, JARUKAMJORN K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2018, 30(1): 1-10. DOI: 10.1515/jbcpp-2018-0036.

[4] NUNES N S, CHANDRAN P, SUNDBY M, *et al*. Therapeutic ultrasound attenuates DSS-induced colitis through the cholinergic anti-inflammatorypathway[J]. EBioMedicine, 2019, 45: 495-510. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.06.033.

[5] KO J K, AUYEUNG KK. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy[J]. Curr Pharm Des,

2014, 20(7): 1082-1096. DOI: 10.2174/138161281 13199990416.

[6] 刘金国, 蔺晓源, 张文秀, 等. 健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠 IFN-γ、IL-10、TGF-β1 的影响[J]. 中医药信息, 2015, 32(4): 7-9. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.2015.04.003.
LIU J G, LIN X Y, ZHANG W X, *et al*. Effect ofjianpi Yichang powder on IFN-γ, IL-10 and TGF-β1 in ulcerative colitis rats[J]. Inf Tradit Chin Med, 2015, 32(4): 7-9. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.2015.04.003.

[7] PETITO V, GRAZIANI C, LOPETUSO L R, *et al*. Anti-tumor necrosis factor α therapy associates to type 17 helper T lymphocytes immunological shift and significant microbial changes in dextran sodiumsulphate colitis[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(12): 1465-1477. DOI: 10.3748/wjg.v25.i12.1465.

[8] GUAN Q D, ZHANG J G. Recent advances: the imbalance of cytokines in the pathogenesis of inflammatory boweldisease [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017, 12(2): 4810258. DOI: 10.1155/2017/4810258.

[9] WANG C, KANG S G, LEE J, *et al*. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T cell balance in thegut[J]. Mucosal Immunol, 2009, 2(2): 173-183. DOI: 10.1038/mi.2008.84.

[10] LOHR J, KNOECHEL B, CARETTO D, *et al*. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells[J]. Microbes Infect, 2009, 11(5): 589-593. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.04.012.

[11] 徐磊, 沈雁, 钟继红, 等. 姜黄素对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病变及细胞因子表达水平的影响[J]. 预防医学, 2019, 31(4): 381-384, 389. DOI: 10.19485/ j.cnki.issn2096-5087.2019.04.014.
XU L, SHEN Y, ZHONG J H, *et al*. Effects ofcurcumin on colonic lesions and expression of pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines in mice with ulcerative colitis[J]. Prev Med, 2019, 31(4): 381-384, 389. DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.04.014.

[12] SINGH B N, SHANKAR S, SRIVASTAVA R K. Green teacatechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(12): 1807-1821. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.07.093.

[13] YANG X L, GUO T K, WANG Y H, *et al*. Therapeutic effect ofginsenoside Rd in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis[J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(7): 1231-1239. DOI: 10.1007/s12272-012-0714-6.

[14] 白少玉. 芪附理中灌肠方对溃疡性结肠炎模型大鼠 PPARγ/NF-κB 信号通路影响的实验研究[D]. 成都:成都中医药大学,2017.
BAI S Y. Experimental Study on the Effect of Qi Fu Li Zhong Enema Decoction on PPAR-γ/NF-κB signaling pathway in ulcerative colitis model rats [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2017.

[15] BUTZNER J D, PARMAR R, BELL C J, *et al*. Butyrate Enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat[J]. Gut, 1996, 38(4): 568-573. DOI: 10.1136/gut.38.4.568.

[16] SEIF F, KHOSHMIRSAFA M, AAZAMI H, *et al*. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells[J]. Cell Commun Signal, 2017, 15(1): 23. DOI: 10.1186/s12964-017-0177-y.

[17] LONG Y, LI S X, QIN J C, *et al*. Kuijieling regulates the differentiation of Treg and Th17 cells to ameliorate experimental colitis in rats[J]. Biomedecine Pharmacother, 2018, 105: 781-788. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.011.

[18] KWON S, SEO E, LEE S, *et al*. T cell-specific knockout of STAT3 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by reducing the inflammatoryresponse [J]. Immune Netw, 2018, 18(4): 1-14. DOI: 10.4110/in.2018.18.e30.

[19] SZKARADKIEWICZ A, MARCINIAK R, CHUDZICKA-STRUGAŁA I, *et al*. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009, 57(4): 291-294. DOI: 10.1007/s00005-009-0031-z.

[20] ZOU Y, DAI S X, CHI H G, *et al*. Baicalin attenuates TNBS-induced colitis in rats by modulating the Th17/Treg paradigm[J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(10): 1873-1887. DOI: 10.1007/s12272-014-0486-2.

[21] 董艳, 曹永清, 陆金根. IL-6/STAT3 信号通路在溃疡性结肠炎发病中的机制及香连丸对其的干预作用[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(6): 75-79. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2016.06.025.
DONG Y, CAO Y Q, LU J G. Study on mechanism of IL-6/STAT3 signaling pathway in ulcerative colitis and intervention by"Xianglian Pill"[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2016, 50(6): 75-79. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2016.06.025.

[22] XU M, DUAN X Y, CHEN Q Y, *et al*. Effect of compound-sophorae decoction on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice by regulating Th17/Treg cell balance [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 2396-2408. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.087.

[23] XU M, ZUO D, LIU XX, *et al*. MiR-155 contributes to Th17 cells differentiation in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mice *via* Jarid2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 488(1): 6-14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.143.

[24] JIN Y, LIN Y, LIN L J, *et al*. IL-17/IFN-γ interactions regulate intestinal inflammation in TNBS-induced acutecolitis [J]. J Interferon Cytokine Res, 2012, 32(11): 548-556. DOI: 10.1089/jir.2012.0030.

[25] YAO J, WEI C, WANG J Y, *et al*. Effect of resveratrol on-Treg/Th17 signaling and ulcerative colitis treatment in mice [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(21): 6572-6581. DOI: 10.3748/wjg.v21.i21.6572.

[26] 王忠锐, 陈红旗, 杨俊. 乳酸菌对 IL-10-/-小鼠肠黏膜屏障损伤修复的机制研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2015, 18(11): 845-850.
WANG Z R, CHEN H Q, YANG J. Mechanism of lactic Bacteria on intestinal mucosal barrier injury repair in interleukin-10 knockoutmice[J]. Chin J Curr Adv Gen Surg, 2015, 18(11): 845-850.

[27] YANG F L, WANG D N, LI Y, *et al*. Th1/Th2 balance and Th17/treg-mediated immunity in relation to murine resistance to dextran sulfate-induced colitis[J]. J Immunol Res, 2017, 2017 (1): 7047201. DOI: 10.1155/2017/7047201.

[28] LI Q L, SHAN Q Y, SANG X N, *et al*. Total glycosides of peony protects against inflammatory bowel disease by regulating IL-23/IL-17 axis and Th17/treg balance[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(1): 177-201. DOI: 10.1142/S0192415X19500095.

[29] QU C, YUAN Z W, YU X T, *et al*. Patchouli alcohol ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophancatabolism[J]. Pharmacol Res, 2017, 121(7): 70-82. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.04.017.

[30] GOMES R G, BRITO C AA, MARTINELLI V F, *et al*. HLA-G is expressed in intestinal samples of ulcerative colitis and Crohn's disease patients and HLA-G5 expression is differentially correlated with TNF and IL-10 cytokine expression [J]. Hum Immunol, 2018, 79(6): 477-484. DOI: 10.1016/j.humimm.2018.03.006.

(**收稿**:2019-10-20;**修回**:2019-12-28)

(编辑 汪勤俭)