基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003586

苓桂术甘汤调控miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号通路对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜屏障及免疫平衡的影响

朱阳阳，李　倩，刘　萌，徐青霞，唐晓燕，蒲金凤，唐学贵
（川北医学院附属医院中西医结合肛肠科，南充　637000）

【摘　要】**目的：**探讨苓桂术甘汤调控miR-140-5p/Toll样受体4（toll like receptor 4，TLR4）/核转录因子-κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）信号通路对溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）大鼠肠黏膜屏障及免疫平衡的影响。**方法：**取SD大鼠用2，4，6-三硝基苯磺酸（2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution，TNBS）诱导建立UC模型，随机分为5组：模型组、苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组、NC-miR-140-5p（miR-140-5p阴性对照）组、苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir（miR-140-5p抑制剂）组，每组10只，另取10只大鼠作对照组，分组干预后检测大鼠结肠黏膜损伤指数（colonic mucosal injury index，CMDI）评分与结肠长度；透射电镜观察各组大鼠结肠黏膜屏障超微结构；流式细胞实验检测各组大鼠外周血Treg、Th17细胞比例及Treg/Th17比值；ELISA检测大鼠血清免疫炎症相关因子白细胞介素（interleukin，IL）-6、IL-17、IL-10、转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）水平；采用实时荧光PCR及免疫印迹法检测大鼠结肠黏膜组织miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号相关因子表达。**结果：**与对照组比较，模型组大鼠结肠黏膜屏障超微结构损伤严重，CMDI、Th17细胞比例、血清IL-6与IL-17水平、结肠黏膜组织TLR4 mRNA、蛋白表达与p-NF-κB p65/NF-κB p65显著升高（$P<0.05$），结肠长度、Treg细胞比例、Treg/Th17比值、血清IL-10与TGF-β1水平、结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达与miR-140-5p表达显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组大鼠结肠黏膜屏障超微结构损伤均减轻，CMDI、Th17细胞比例、血清IL-6与IL-17水平、结肠黏膜组织TLR4 mRNA、蛋白表达与p-NF-κB p65/NF-κB p65均降低（$P<0.05$），结肠长度、Treg细胞比例、Treg/Th17比值、血清IL-10与TGF-β1水平、结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达与miR-140-5p表达均升高（$P<0.05$）；NC-miR-140-5p组大鼠各指标差异无统计学意义（$P>0.05$）；高剂量苓桂术甘汤作用更强。下调miR-140-5p可减弱高剂量苓桂术甘汤对UC模型大鼠各指标的作用。**结论：**苓桂术甘汤可通过上调miR-140-5p而抑制TLR4/NF-κB信号激活，进而促使Treg/Th17免疫平衡向Treg偏移，抑制免疫炎症，减轻UC大鼠肠黏膜屏障损伤。

【关键词】苓桂术甘汤；miR-140-5p/TLR4/NF-κB；溃疡性结肠炎；肠黏膜屏障；免疫平衡
【中图分类号】R574.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2024-01-03

Effect of Linggui Zhugan decoction on intestinal mucosal barrier and immune balance in rats with ulcerative colitis by regulating the miR-140-5p/Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling pathway

Zhu Yangyang，Li Qian，Liu Meng，Xu Qingxia，Tang Xiaoyan，Pu Jinfeng，Tang Xuegui
（*Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Coloproctology，Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the effect of Linggui Zhugan decoction on intestinal mucosal barrier and immune balance in rats with ulcerative colitis（UC）by regulating the miR-140-5p/Toll like receptor 4（TLR4）/nuclear factor-kappa B（NF-κB）signaling pathway. ***Methods***：Sprague-Dawley rats were induced with 2，4，6-trinitrobenzene sulfonic acid to establish a model of UC，and then the rats were randomly divided into model group，low-dose Linggui Zhugan decoction group，high-dose Linggui Zhugan decoction group，NC-miR-140-5p（miR-140-5p negative control）group，and high-dose Linggui Zhugan decoction group+miR-140-5p antagonist（miR-140-5p inhibitor）group，with 10 rats in each group. Another 10 rats were selected as control group. After grouping and intervention，colonic mucosal injury index（CMDI）score and colon length were measured for each group；transmission electron micros-

作者介绍：朱阳阳，Email：zhuyangyang2022@163.com，研究方向：溃疡性结肠炎。
通信作者：唐学贵，Email：Txg668nc@sohu.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81573990）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.0939.016（2024-09-27）

copy was used to observe the ultrastructure of intestinal mucosal barrier; flow cytometry was used to measure the percentages of Treg and Th17 cells in peripheral blood and Treg/Th17 ratio; ELISA was used to measure the serum levels of immune inflammatory factors such as interleukin-6(IL-6), interleukin-17(IL-17), interleukin-10(IL-10), and transforming growth factor-β1(TGF-β1) in rats; quantitative real-time PCR and Western blotting were used to measure the expression of the factors associated with the miR-140-5p/TLR4/NF-κB signaling pathway in the colonic mucosal tissue of rats. ***Results***: Compared with the control group, the model group had severe damage of the ultrastructure of colonic mucosal barrier and significant increases in CMDI, the percentage of Th17 cells, the serum levels of IL-6 and IL-17, the mRNA and protein expression levels of TLR4 in colonic mucosal tissue, and p-NF-κB p65/NF-κB p65(P<0.05), as well as significant reductions in colon length, the percentage of Treg cells, Treg/Th17 ratio, the serum levels of IL-10 and TGF-β1, the protein expression levels of claudin-1 and claudin-4, and the expression of miR-140-5p in colonic mucosal tissue (P<0.05). Compared with the model group, the low- and high-dose Linggui Zhugan decoction groups had alleviation of the damaged ultrastructure of colonic mucosal barrier and significant reductions in CMDI, the percentage of Th17 cells, the serum levels of IL-6 and IL-17, the mRNA and protein expression levels of TLR4 in colonic mucosal tissue, and p-NF-κB p65/NF-κB p65(P<0.05), as well as significant increases in colon length, the percentage of Treg cells, Treg/Th17 ratio, the serum levels of IL-10 and TGF-β1, the protein expression levels of claudin-1 and claudin-4, and the expression of miR-140-5p in colonic mucosal tissue(P<0.05). The NC-miR-140-5p group had no significant changes in these indicators(P>0.05), and high-dose Linggui Zhugan decoction had a stronger effect. Downregulation of miR-140-5p could weaken the effect of high-dose Linggui Zhugan decoction on various indicators in a rat model of UC. ***Conclusion***: Linggui Zhugan decoction can inhibit TLR4/NF-κB signal activation by upregulating miR-140-5p, thereby promoting the shift of Treg/Th17 immune balance to Treg, inhibiting immune inflammation, and alleviating intestinal mucosal barrier damage in UC rats.

【Key words】Linggui Zhugan decoction; miR-140-5p/Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B; ulcerative colitis; intestinal mucosal barrier; immune balance

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）是常见的一种炎症性肠道疾病，腹泻、腹痛、脓血便、黏液便、体重减轻等是患者主要临床症状，有时会伴有关节炎、肝胆管病等并发症，患者病情迁延且易复发，是我国消化内科常见的难治疾病[1-2]。UC作为一种肠道炎症性疾病，Treg/Th17免疫平衡失衡引发的免疫炎症在其发病过程中起到关键作用，通过调节Treg/Th17平衡来进行抗炎处理，可有效改善UC大鼠模型结肠炎症状[3]。miR-140-5p是可调控炎症反应的一种RNA分子，可通过抑制炎症而减轻荚膜梭菌β2毒素诱导的猪肠上皮细胞损伤[4]，Toll样受体4（toll like receptor 4，TLR4）是miR-140-5p的常见下游靶点，miR-140-5p可通过下调TLR4而抑制骨关节炎软骨细胞中炎症介质的产生[5]，而有研究表明TLR4/核转录因子-κB（nuclear transcription factor-κB，NF-κB）信号与UC的发生发展关系密切，抑制其激活可通过抗凋亡、抗氧化和抗炎而减轻UC大鼠结肠组织损伤[6]，并可促使Treg细胞分化及其细胞因子的产生，同时抑制Th17细胞分化及其细胞因子的产生，进而通过恢复Treg/Th17细胞之间的免疫平衡、抑制免疫炎症和重塑肠道微生物群而减轻UC小鼠结肠炎症状[7]，由此可知调控miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号可能是治疗UC的有效措施。苓桂术甘汤是具有健脾利水和温阳化饮作用的经典名方，现代药理学研究表明该方可起到明显免疫调控、抗炎与细胞保护作用[8]，可上调急性心肌梗死大鼠肠组织紧密连接蛋白表达并降低炎症因子表达，进而通过抑制炎症而减轻其肠黏膜屏障损伤[9]，另外苓桂术甘汤还可阻断TLR4/Myd88/NF-κB信号传导并抑制心力衰竭大鼠炎症[10]，因而推测苓桂术甘汤可能通过调控miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号介导UC的发生发展过程，本文通过建立UC大鼠模型，探究苓桂术甘汤调控miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号通路对其肠黏膜屏障及免疫平衡的影响。

1 材 料

1.1 动物

SD雄性大鼠（体质量190~220 g，6周龄左右，SPF级），购于辽宁长生生物技术有限公司，生产许可SCXK（辽）2020-0001。在动物饲养笼房中适应喂养，每笼不超过5只，温度23~25 ℃，湿度55%~65%，每日早晨更换新饲料并保证饲料、干净饮用水充足，保证12 h/12 h明暗循环照明。

1.2 主要试剂及仪器

苓桂术甘汤（茯苓、桂枝、甘草、白术），各组成药材饮片购于安徽普仁中药饮片有限公司；5%的2,4,6-三硝基苯磺酸（2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution，TNBS）水溶液（批号1029065），购于北京中科仪友化工技术研究；一步法反转录荧光定量PCR试剂盒、miR-140-5p antagomir及其阴性对照、miR-140-5p、TLR4、β-actin与U6引物，购于上海生工生物工程股份有限公司；总RNA提取试剂（Trizol）、大鼠白细胞介素（interleukin，IL）-6、IL-17、IL-10与转化生长因子β1（transforming growth factor β1，TGF-β1）酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒，购于上海爱必信生物科技有限公司；大鼠外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）分离液，购于苏州汇智和源生物技术有限公司；FITC标记的抗大鼠CD4一抗（CD4-FITC）、PE标记的抗大鼠IL-17A一抗（IL-17A-PE）、HRP标记的小鼠抗兔二抗、PE标记的抗大鼠Foxp3一抗（Foxp3-PE）、兔源抗大鼠TLR4、p-NF-κB p65、NF-κB p65与β-actin一抗，购于英国Abcam公司等。

T型超薄切片机、SM2010 R切片机，购于德国Leica公司；JEM-1400Flash透射电子显微镜，购于日本电子株式会社；ASOOZ酶联免疫检测仪，购于瑞士Tecan公司；CytoFLEX流式细胞仪，购于上海贝克曼库尔特国际贸易有限公司；QQ1000荧光定量PCR仪，购于上海启前电子科技有限公司；DYCZ-24DN垂直板电泳仪、DYY-7C电泳仪电源、WD-9413B型凝胶成像分析系统、DYCZ-TRANS2型转印电泳仪，购于北京市六一仪器厂等。

1.3 方法

1.3.1 建立UC大鼠模型及分组干预 参照文献[11]用TNBS诱导建立UC模型：取SD大鼠禁食但自由饮水24 h，以40 mg/kg的戊巴比妥钠进行麻醉，于结肠内（深入肛门约8 cm）注入4 mL/kg的5%TNBS+50%乙醇混合液，倒置大鼠并捏紧肛门，5 min后于头低足高位放置，待其自然苏醒后放回饲养笼中继续饲养3 d，若大鼠出现腹泻、肛周污秽、稀便、便血等症状，表明UC模型建立成功，用随机数表法随机分为5组：模型组、苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组、NC-miR-140-5p组、苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组，每组10只，另取10只大鼠以同样方法向结肠内注入等剂量生理盐水+50%乙醇混合液，设为对照组。

取茯苓、桂枝、甘草、白术中药饮片以4∶3∶3∶2的比例配比，加入10倍量的水浸泡、煮沸、过滤，然后再次加水重复1次，将2次的滤液进行浓缩，并配制为生药含量为0.42、0.84 g/mL的苓桂术甘汤液备用。各组大鼠于造模成功后进行分组干预：苓桂术甘汤低剂量（4.2 g/kg）组、苓桂术甘汤高剂量（8.4 g/kg）组大鼠分别灌胃0.42、0.84 g/mL的苓桂术甘汤液10 mL/kg[9]，同时尾静脉注射与苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组等剂量的生理盐水；NC-miR-140-5p组大鼠灌胃10 mL/kg的生理盐水，同时尾静脉注射miR-140-5p阴性对照（溶于生理盐水，剂量参考说明书）；苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组大鼠灌胃0.84 g/mL的苓桂术甘汤液10 mL/kg，同时尾静脉注射miR-140-5p antagomir（溶于生理盐水，剂量参考说明书）；模型组、对照组大鼠灌胃10mL/kg的生理盐水，同时尾静脉注射与苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组等剂量的生理盐水，灌胃时每天1次，尾静脉注射是每周2次，各组大鼠均在干预3周后采集标本做后续检测。

1.3.2 检测大鼠结肠黏膜损伤指数（colon mucosa damage index，CMDI）、结肠长度并采集标本 3周干预完成后24 h以乙醚麻醉各组大鼠，切开腹腔后自腹主动脉采集大鼠外周血约2.5 mL，与等体积PBMC分离液混匀后进行离心分离出PBMC，洗涤计数后将其细胞浓度调整为1×10^7个/mL备用；再次采集腹主动脉学约1 mL，4 ℃、2 000 r/min、12 min离心后将上清（即血清）存在-20 ℃冰柜备用。

取大鼠肛门到回盲部的结肠，测量其长度后评测CMDI，评测标准参考文献[12]：结肠黏膜无水肿、充血、溃疡等损伤症状，0分；结肠黏膜水肿、充血但未发生溃疡，1分；结肠黏膜水肿、充血并出现轻度糜烂，但未发生溃疡，2分；结肠黏膜水肿、充血并出现中度糜烂，且发生单个溃疡，3分；结肠黏膜水肿、充血并出现高度糜烂，且发生多处溃疡，4分；结肠黏膜水肿、充血并出现重度糜烂，且发生>1 cm的溃疡，5分。

取CMDI评测后的各组大鼠结肠，剪下距离肛门约2 cm的结肠0.5 cm，在4%戊二醛中固定后进行梯度脱水、包埋、固化，用超薄切片机切为超薄片备用。再次剪下一段约5cm的结肠，取黏膜组织分为2份，一份加入Trizol试剂，于研钵内研磨后提取其中总RNA，测出其浓度后存在-20 ℃冰柜备用；另一份结肠黏膜组织加入RAPI试剂，冰水浴中高速匀浆后提取其中总蛋白，用BCA法测出其浓度后存在-20 ℃冰柜备用。

1.3.3 透射电镜观察各组大鼠结肠黏膜屏障超微结构 取1.4中的结肠黏膜组织超薄片，以醋酸铀和枸橼酸铅进行双染，用透射电镜对结肠黏膜屏障超微结构进行观察和拍照。

1.3.4 流式细胞实验检测各组大鼠外周血Treg、Th17细胞比例及Treg/Th17比值 取1.4中的PBMC细胞悬液0.1 mL，以CD4-FITC抗体避光孵育后洗涤，用PBS重悬细胞后以Foxp3-PE（或IL-17A-PE）抗体避光孵育后洗涤，对照管加入等量同型对照抗体，然后以4%多聚甲醛0.5 mL进行重悬后上机，用流式细胞仪检测外周血Treg、Th17细胞比例并计算Treg/Th17比值。

1.3.5 ELISA检测大鼠血清免疫炎症相关因子水平 取1.4中的血清用冰水浴解冻，采用ELISA试剂盒测定其中IL-6、IL-17、IL-10、TGF-β1水平，具体检测方法如试剂盒说明书

中所示。

1.3.6 实时荧光PCR检测大鼠结肠黏膜组织miR-140-5p与TLR4表达 取1.4中的结肠黏膜组织总RNA，与miR-140-5p或TLR4、β-actin、U6引物、双蒸水、酶预混液混匀制成20 μL的反应体系，按照一步法反转录荧光定量PCR试剂盒说明书中方法进行PCR扩增，40个循环后得到各组miR-140-5p或TLR4、β-actin、U6基因循环阈值，以$2^{-\Delta\Delta Ct}$算法分析量化各组miR-140-5p、TLR4相对表达，miR-140-5p以U6为内参对照，而TLR4以β-actin为内参对照，引物序列见表1。

表1 qRT-PCR基因引物序列

引物名称	方向	序列(5'-3')
miR-140-5p	F	ACACTCCAGCTGGGCAGTGGTTTTACCCTA
	R	TGGTGTCGTGGAGTCG
U6	F	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	R	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT
TLR4	F	AGACATCCAAAGGAATACTGCAA
	R	GCCTTCATGTCTATAGGTGATGC
β-actin	F	TACCTCATGAAGATCCTCACCGA
	R	AAGCATTTGCGGTGGACGAT

1.3.7 免疫印迹法检测大鼠结肠黏膜组织miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号相关蛋白表达 取1.4中的结肠黏膜组织总蛋白样品，加热变性后每组各取20 μg，上样行电泳分离、湿式转移，封闭蛋白非特异位点后孵育兔源抗大鼠TLR4或p-NF-κB p65、NF-κB p65、β-actin一抗，洗膜后用HRP标记的小鼠抗兔二抗行抗原抗体反应，用化学试剂显影后拍照，用Image pro软件定量各组蛋白灰度值，用内参β-actin作对照量化各组TLR4或p-NF-κB p65、NF-κB p65相对表达，并计算p-NF-κB p65/NF-κB p65比值。

1.4 统计学方法

采用统计SPSS 24.0软件对实验数据进行分析。以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行表示，多组间的差异比较进行单因素方差分析，两两之间进一步差异比较行LSD-t检验。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 各组大鼠CMDI评分与结肠长度的检测结果

与对照组比较，模型组大鼠CMDI明显升高（P<0.000 1），结肠长度明显降低（P<0.000 1）。与模型组比较，苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组大鼠CMDI均降低（P<0.000 1、P<0.000 1），结肠长度均升高（P<0.05）；NC-miR-140-5p组大鼠CMDI、结肠长度无明显变化（CMDI：P=0.998 6；结肠长度：P=0.999 6）。与苓桂术甘汤低剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组大鼠CMDI降低（P<0.000 1），结肠长度升高（P<0.000 1）。与苓桂术甘汤高剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组大鼠CMDI升高（P<0.000 1），结肠长度降低（P<0.000 1）。见表2。

表2 各组大鼠CMDI、结肠长度($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CMDI(分)	结肠长度(cm)
对照组	10	0.00 ± 0.00	23.16 ± 1.31
模型组	10	4.10 ± 0.65[a]	16.05 ± 0.82[a]
苓桂术甘汤低剂量组	10	2.30 ± 0.51[ab]	18.97 ± 1.03[ab]
苓桂术甘汤高剂量组	10	0.70 ± 0.46[bc]	22.02 ± 1.12[bc]
NC-miR-140-5p组	10	4.20 ± 0.69[a]	15.91 ± 0.96[a]
苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组	10	3.60 ± 0.71[ad]	16.42 ± 0.85[ad]
F值	–	103.600	96.360
P值	–	0.000	0.000

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与模型组比较，P<0.05；c，与苓桂术甘汤低剂量组比较，P<0.05；d，与苓桂术甘汤高剂量组比较，P<0.05

2.2 各组大鼠肠黏膜屏障超微结构的检测结果

对照组大鼠结肠黏膜屏障超微结构完好：上皮细胞间紧密结构正常且细胞排列整齐，表面微绒毛结构完整、清晰；模型组大鼠结肠黏膜屏障超微结构损伤严重：上皮细胞间紧密结构破损、不完整、不连续，表面微绒毛肿胀稀疏；与模型组比较，苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组大鼠结肠黏膜屏障超微结构损伤均减轻且苓桂术甘汤高剂量组减轻程度更大，NC-miR-140-5p组大鼠结肠黏膜屏障超微结构损伤无明显变化；与苓桂术甘汤高剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组大鼠结肠黏膜屏障超微结构损伤加重。见图1。

2.3 各组大鼠外周血Treg/Th17免疫平衡的检测结果

与对照组比较，模型组大鼠Th17细胞比例明显升高（P<0.000 1），Treg细胞比例、Treg/Th17比值明显降低（Treg细胞比例：P<0.000 1；Treg/Th17比值：P<0.000 1）。与模型组比较，苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组大鼠Th17细胞比例均降低（P<0.000 1、P<0.000 1），Treg细胞比例、Treg/Th17比值均升高（Treg细胞比例：P<0.000 1、P<0.000 1；Treg/Th17比值：P=0.000 6、P<0.000 1）；NC-miR-140-5p组大鼠Th17细胞比例、Treg细胞比例、Treg/Th17比值无显著变化（Th17细胞比例：P=0.999 9；Treg细胞比例：P=0.999 7；Treg/Th17比值：P>0.999 9）。与苓桂术甘汤低剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组大鼠Th17细胞比例降低（P<0.000 1），Treg细胞比例、Treg/Th17比值升高（Treg细胞比例：P<0.000 1；Treg/Th17比值：P<0.000 1）。与苓桂术甘汤高剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组大鼠Th17细胞比例升高（P<0.000 1），Treg细胞比例、Treg/Th17比值降低（Treg细胞比例：P<0.000 1；Treg/Th17比值：P<0.000 1）。见图2、表3。

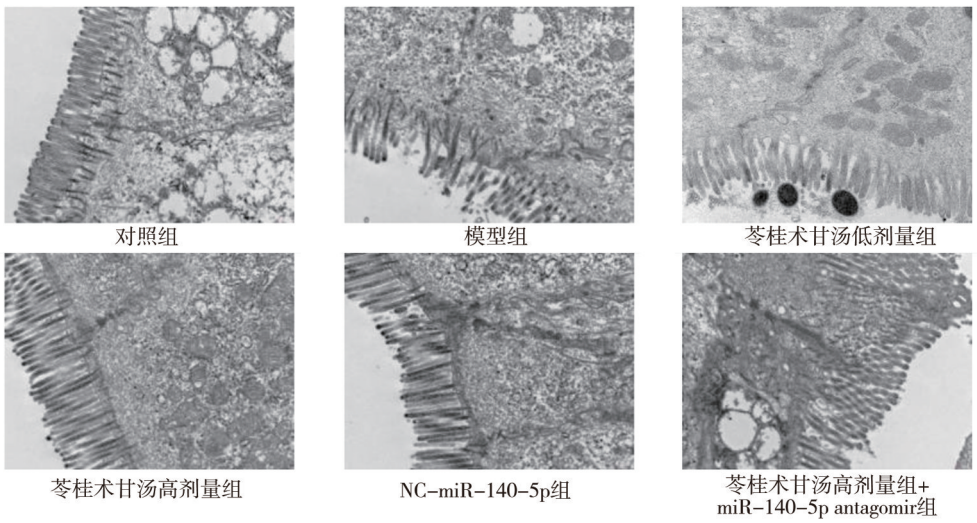


图1　透射电镜观察各组大鼠结肠黏膜屏障超微结构（8 000×）

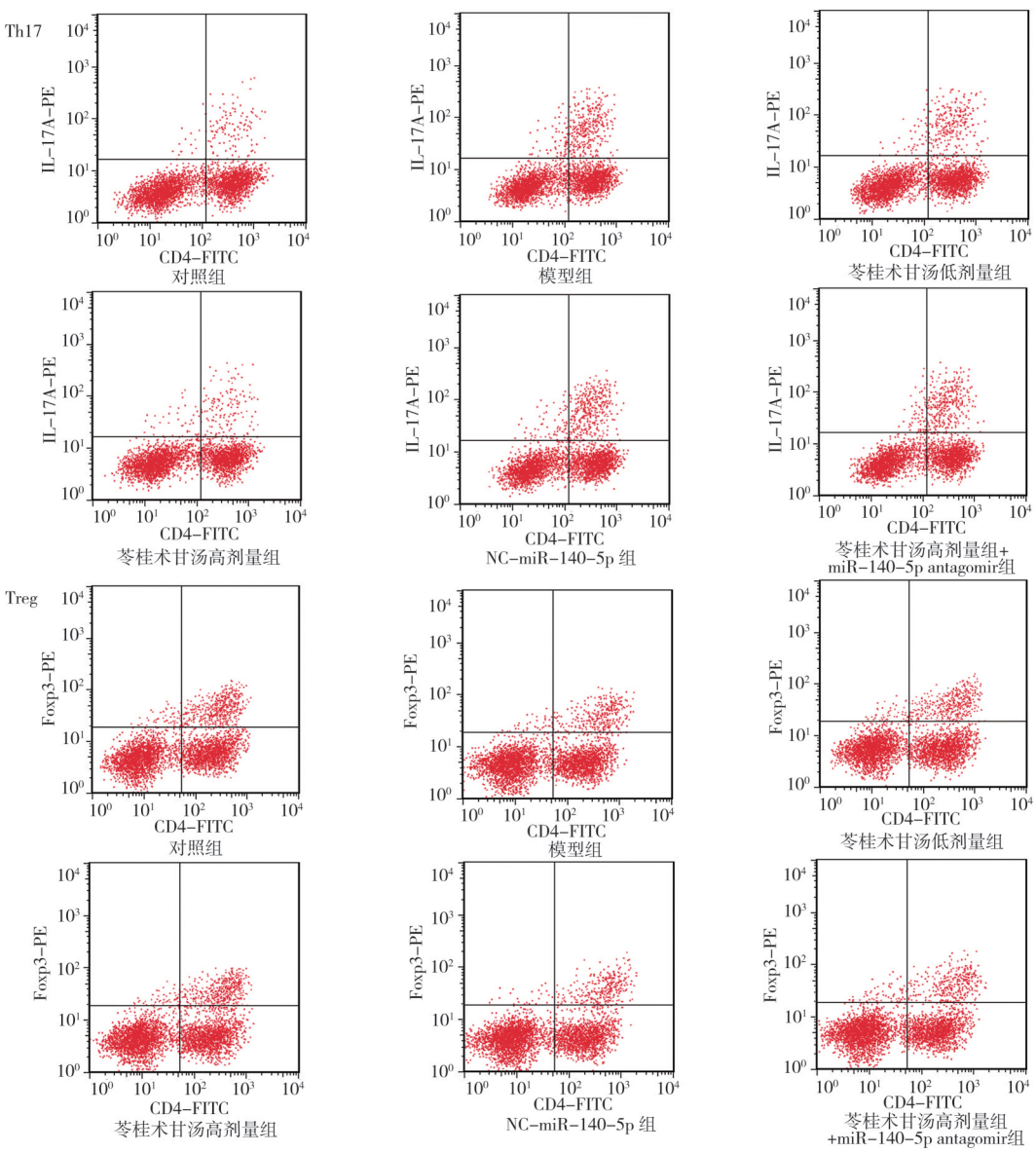


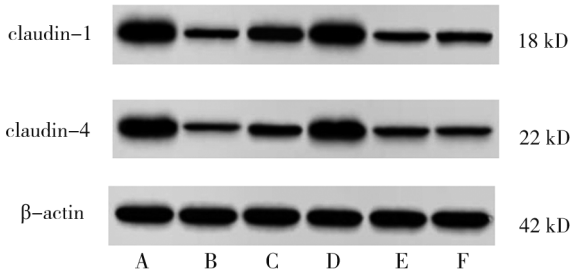
图2　流式细胞实验检测各组大鼠外周血Treg、Th17细胞比例

2.4 各组大鼠血清免疫炎症相关因子水平的检测结果

与对照组比较，模型组大鼠血清IL-6、IL-17水平明显升高（IL-6：$P<0.000\ 1$；IL-17：$P<0.000\ 1$），IL-10、TGF-β1水平明显降低（IL-10：$P<0.000\ 1$；TGF-β1：$P<0.000\ 1$）。与模型组比较，苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组大鼠血清IL-6、IL-17水平均降低（IL-6：$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$；IL-17：$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$），IL-10、TGF-β1水平均升高（IL-10：$P<0.000\ 1$、$P<0.0001$；TGF-β1：$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$）；NC-miR-140-5p组大鼠血清IL-6、IL-17、IL-10、TGF-β1水平无明显变化（IL-6：$P=0.999\ 0$；IL-17：$P=0.922\ 4$；IL-10：$P=0.995\ 9$；TGF-β1：$P>0.999\ 9$）。与苓桂术甘汤低剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组大鼠血清IL-6、IL-17水平降低（IL-6：$P<0.000\ 1$；IL-17：$P<0.000\ 1$），IL-10、TGF-β1水平升高（IL-10：$P<0.000\ 1$；TGF-β1：$P<0.000\ 1$）。与苓桂术甘汤高剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组大鼠血清IL-6、IL-17水平升高（IL-6：$P<0.000\ 1$；IL-17：$P<0.000\ 1$），IL-10、TGF-β1水平降低（IL-10：$P<0.000\ 1$；TGF-β1：$P<0.000\ 1$）。见表4。

2.5 各组大鼠结肠黏膜组织紧密连接蛋白表达的检测结果

与对照组比较，模型组大鼠结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达显著降低（claudin-1：$P<0.000\ 1$；claudin-4：$P<0.000\ 1$）。与模型组比较，苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组大鼠结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达均升高（claudin-1：$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$；claudin-4：$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$）；NC-miR-140-5p组大鼠结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达无显著变化（claudin-1：$P>0.999\ 9$；claudin-4：$P=0.999\ 6$）。与苓桂术甘汤低剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组大鼠结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达升高（claudin-1：$P<0.000\ 1$；claudin-4：$P<0.000\ 1$）。与苓桂术甘汤高剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组大鼠结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达降低（claudin-1：$P<0.000\ 1$；claudin-4：$P<0.000\ 1$）。见图3、表5。



注：A：对照组；B：模型组；C：苓桂术甘汤低剂量组；D：苓桂术甘汤高剂量组；E：NC-miR-140-5p组；F：苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组

图3 免疫印迹检测各组大鼠结肠黏膜组织紧密连接蛋白claudin-1、claudin-4表达

表3 各组大鼠Th17与Treg细胞比例、Treg/Th17比值（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	Treg细胞比例（%）	Th17细胞比例（%）	Treg/Th17比值
对照组	10	4.79 ± 0.31	1.30 ± 0.19	3.68 ± 0.41
模型组	10	3.48 ± 0.18[a]	3.57 ± 0.33[a]	0.97 ± 0.28[a]
苓桂术甘汤低剂量组	10	4.03 ± 0.21[ab]	2.48 ± 0.27[ab]	1.62 ± 0.30[ab]
苓桂术甘汤高剂量组	10	4.71 ± 0.25[bc]	1.39 ± 0.23[bc]	3.39 ± 0.35[bc]
NC-miR-140-5p组	10	3.45 ± 0.17[a]	3.60 ± 0.31[a]	0.96 ± 0.29[a]
苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组	10	3.52 ± 0.19[ad]	3.51 ± 0.32[ad]	1.00 ± 0.32[ad]
*F*值	–	77.270	151.600	149.000
*P*值	–	0.000	0.000	0.000

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与模型组比较，$P<0.05$；c，与苓桂术甘汤低剂量组比较，$P<0.05$；d，与苓桂术甘汤高剂量组比较，$P<0.05$

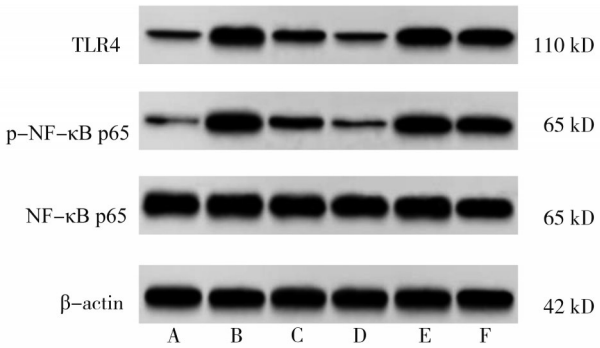
表4 各组大鼠血清IL-6、IL-17、IL-10、TGF-β1水平（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	IL-6（ng/L）	IL-17（ng/L）	IL-10（ng/L）	TGF-β1（ng/L）
对照组	10	41.76 ± 4.78	20.14 ± 2.91	39.12 ± 3.12	67.82 ± 5.43
模型组	10	120.42 ± 6.43[a]	63.52 ± 3.82[a]	11.96 ± 1.83[a]	23.15 ± 3.19[a]
苓桂术甘汤低剂量组	10	85.64 ± 5.21[ab]	45.01 ± 3.14[ab]	23.64 ± 2.13[ab]	42.59 ± 3.70[ab]
苓桂术甘汤高剂量组	10	47.80 ± 4.92[bc]	24.72 ± 3.10[bc]	34.79 ± 3.25[bc]	63.14 ± 4.92[bc]
NC-miR-140-5p组	10	121.36 ± 6.36[a]	65.02 ± 3.93[a]	11.40 ± 1.91[a]	22.76 ± 3.40[a]
苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir组	10	112.01 ± 6.15[ad]	57.04 ± 3.51[ad]	13.06 ± 2.34[ad]	25.39 ± 3.23[ad]
*F*值	–	402.400	326.600	241.800	254.000
*P*值	–	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与模型组比较，$P<0.05$；c，与苓桂术甘汤低剂量组比较，$P<0.05$；d，与苓桂术甘汤高剂量组比较，$P<0.05$

2.6 各组大鼠结肠黏膜组织 miR-140-5p/TLR4/NF-κB 信号相关因子表达的检测结果

与对照组比较，模型组大鼠结肠黏膜组织 TLR4 mRNA 与蛋白表达、p-NF-κB p65/NF-κB p65 显著升高（TLR4 mRNA：$P<0.000\ 1$；TLR4 蛋白：$P<0.000\ 1$；p-NF-κB p65/NF-κB p65：$P<0.000\ 1$），miR-140-5p 表达显著降低（$P<0.000\ 1$）。与模型组比较，苓桂术甘汤低剂量组、苓桂术甘汤高剂量组大鼠结肠黏膜组织 TLR4 mRNA 与蛋白表达、p-NF-κB p65/NF-κB p65 均降低（TLR4 mRNA：$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$；TLR4 蛋白：$P<0.000\ 1$、$P<0.0001$；p-NF-κB p65/NF-κB p65：$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$），miR-140-5p 表达均升高（$P<0.000\ 1$、$P<0.000\ 1$）；NC-miR-140-5p 组大鼠结肠黏膜组织 TLR4 mRNA 与蛋白表达、p-NF-κB p65/NF-κB p65、miR-140-5p 表达无显著变化（TLR4 mRNA：$P=0.999\ 8$；TLR4 蛋白：$P=0.995\ 9$；p-NF-κB p65/NF-κB p65：$P=0.999\ 2$；miR-140-5p：$P>0.999\ 9$）。与苓桂术甘汤低剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组大鼠结肠黏膜组织 TLR4 mRNA 与蛋白表达、p-NF-κB p65/NF-κB p65 降低（TLR4 mRNA：$P<0.000\ 1$；TLR4 蛋白：$P<0.000\ 1$；p-NF-κB p65/NF-κB p65：$P<0.000\ 1$），miR-140-5p 表达升高（$P<0.000\ 1$）。与苓桂术甘汤高剂量组比较，苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir 组大鼠结肠黏膜组织 TLR4 mRNA 与蛋白表达、p-NF-κB p65/NF-κB p65 升高（TLR4 mRNA：$P<0.000\ 1$；TLR4 蛋白：$P<0.000\ 1$；p-NF-κB p65/NF-κB p65：$P<0.000\ 1$），miR-140-5p 表达降低（$P<0.000\ 1$）。见图 4，表 6。



注：A：对照组；B：模型组；C：苓桂术甘汤低剂量组；D：苓桂术甘汤高剂量组；E：NC-miR-140-5p 组；F：苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir 组

图 4 免疫印迹检测各组大鼠结肠黏膜组织 miR-140-5p/TLR4/NF-κB 信号相关蛋白表达

3 讨 论

随着饮食结构和生活方式的改变，我国 UC 患病人数逐年提升，已成为亟需解决的临床问题，如

表 5 各组大鼠结肠黏膜组织紧密连接蛋白 claudin-1、claudin-4 相对表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	claudin-1/β-actin	claudin-4/β-actin
对照组	10	1.28 ± 0.15	1.19 ± 0.11
模型组	10	0.30 ± 0.09[a]	0.18 ± 0.05[a]
苓桂术甘汤低剂量组	10	0.76 ± 0.11[ab]	0.67 ± 0.07[ab]
苓桂术甘汤高剂量组	10	1.24 ± 0.13[bc]	1.16 ± 0.08[bc]
NC-miR-140-5p 组	10	0.29 ± 0.08[a]	0.19 ± 0.06[a]
苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir 组	10	0.32 ± 0.10[ad]	0.20 ± 0.05[ad]
F 值	–	174.300	439.200
P 值	–	0.000	0.000

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与模型组比较，$P<0.05$；c，与苓桂术甘汤低剂量组比较，$P<0.05$；d，与苓桂术甘汤高剂量组比较，$P<0.05$

表 6 各组大鼠结肠黏膜组织 miR-140-5p/TLR4/NF-κB 信号相关因子相对表达（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	例数	mRNA 表达		蛋白表达	
		miR-140-5p/U6	TLR4/β-actin	TLR4/β-actin	p-NF-κB p65/NF-κB p65
对照组	10	1.03 ± 0.14	0.99 ± 0.13	0.16 ± 0.05	0.10 ± 0.02
模型组	10	0.25 ± 0.08[a]	2.17 ± 0.20[a]	1.10 ± 0.11[a]	0.91 ± 0.08[a]
苓桂术甘汤低剂量组	10	0.61 ± 0.10[ab]	1.62 ± 0.18[ab]	0.65 ± 0.07[ab]	0.53 ± 0.05[ab]
苓桂术甘汤高剂量组	10	0.98 ± 0.11[bc]	1.04 ± 0.12[bc]	0.19 ± 0.06[bc]	0.12 ± 0.03[bc]
NC-miR-140-5p 组	10	0.26 ± 0.07[a]	2.15 ± 0.19[a]	1.12 ± 0.10[a]	0.90 ± 0.07[a]
苓桂术甘汤高剂量组+miR-140-5p antagomir 组	10	0.28 ± 0.09[ad]	2.13 ± 0.16[ad]	1.07 ± 0.12[ad]	0.88 ± 0.09[ad]
F 值	–	130.400	112.700	259.200	385.600
P 值	–	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与模型组比较，$P<0.05$；c，与苓桂术甘汤低剂量组比较，$P<0.05$；d，与苓桂术甘汤高剂量组比较，$P<0.05$

今主要依赖药物控制UC症状，皮质类固醇类激素、水杨酸类药物、免疫抑制剂等是常用药物，但会引发腹泻、发烧、皮疹、肾损伤、抽筋等诸多毒副作用，严重限制了其临床疗效，因而需探寻无毒副作用的安全治疗方法[13-14]。本文采用TNBS诱导建立UC模型，结果显示，大鼠出现腹泻、肛周污秽、稀便、便血等症状，其CMDI升高而结肠长度降低，揭示UC模型建立成功。

中医学认为脾胃虚弱、运化失司、湿热蕴结是UC的主要病机，治疗应以温阳健脾、清热燥湿为主，苓桂术甘汤是张仲景所著《伤寒杂病论》中的经典方剂，由茯苓、桂枝、白术、甘草组成，茯苓作为君药健脾、利水、化饮，桂枝作为臣药降逆平冲、温阳化气，白术作为佐药健脾燥湿，甘草调和诸药使其共奏健脾利水、温阳燥湿之功，研究显示苓桂术甘汤可显著调节心衰小鼠肠道菌群结构，修复其肠黏膜屏障[15]，而加味苓桂术甘汤能保护肾纤维化大鼠肠黏膜[16]，因而推测苓桂术甘汤可能对UC具有治疗作用。本文结果显示，以苓桂术甘汤干预治疗UC大鼠，可减轻大鼠结肠黏膜屏障超微结构损伤，降低其CMDI、Th17细胞比例、血清IL-6与IL-17水平，升高其结肠长度、Treg细胞比例、Treg/Th17比值、血清IL-10与TGF-β1水平、结肠黏膜组织claudin-1、claudin-4蛋白表达，表明苓桂术甘汤可促使Treg细胞分化及其抗炎细胞因子IL-10与TGF-β1产生释放，同时抑制Th17细胞分化及其促炎细胞因子IL-6与IL-17产生释放，继而减轻Treg/Th17免疫失衡引发的免疫炎症，揭示苓桂术甘汤可通过调控Treg/Th17免疫平衡并促使其向Treg偏移来抑制免疫炎症，进而减轻结肠黏膜屏障损伤，最终改善其结肠炎症状。

miR-140-5p/TLR4/NF-κB是调控氧化应激、细胞凋亡、炎症及免疫稳态等过程的重要信号，上调miR-140-5p可抑制TLR4/NF-κB信号激活，进而通过抑制炎症因子分泌而减轻多溴二苯醚-47诱导的草鱼肾细胞损伤[17]，还可通过抑制细胞凋亡与炎症而减轻糖尿病诱导的大鼠肾损伤[18]，阻断TLR4/NF-κB信号传导可通过抑制氧化应激、炎症和细胞凋亡而保护UC大鼠肠上皮屏障，重塑紊乱的肠道微生物群和Treg/Th17免疫平衡，进而缓解其结肠炎症状[7,19-20]。本文结果显示，UC大鼠结肠黏膜组织miR-140-5p表达相比对照组显著降低而TLR4 mRNA、蛋白表达与p-NF-κB p65/NF-κB p65显著升高，以苓桂术甘汤干预治疗可逆转UC大鼠上述因子变化趋势，表明miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号参与介导苓桂术甘汤对UC大鼠肠黏膜屏障功能及免疫平衡的改善作用；以苓桂术甘汤干预治疗UC大鼠的同时下调miR-140-5p表达，可减弱苓桂术甘汤单独干预对UC大鼠Treg细胞分化及其抗炎细胞因子IL-10与TGF-β1产生释放的促进作用，同时减弱其对UC大鼠Th17细胞分化及其促炎细胞因子IL-6与IL-17产生释放的抑制作用，最终削弱苓桂术甘汤顿渡干预对UC大鼠免疫炎症的减轻作用，揭示苓桂术甘汤可通过促使Treg/Th17免疫平衡向Treg偏移来抑制Treg/Th17免疫失衡引发的免疫炎症；另外以苓桂术甘汤干预治疗UC大鼠的同时下调miR-140-5p表达，可减弱苓桂术甘汤单独干预对UC大鼠结肠黏膜组织TLR4蛋白表达及NF-κB磷酸化的抑制作用，降低了TLR4/NF-κB信号活性，并拮抗苓桂术甘汤单独干预对UC大鼠免疫炎症与结肠黏膜屏障损伤的减轻作用，最终逆转其对UC大鼠结肠炎症状的缓解作用，揭示苓桂术甘汤改善UC大鼠免疫平衡稳态并减轻其肠黏膜屏障损伤可能是通过上调miR-140-5p来抑制TLR4/NF-κB信号激活实现的。

综上所述，苓桂术甘汤可通过上调miR-140-5p而降低TLR4蛋白表达及NF-κB磷酸化，进而调控UC大鼠Treg/Th17免疫平衡并促使其向Treg偏移，减轻其免疫炎症及结肠黏膜屏障损伤，最终缓解大鼠结肠炎症状，阻断miR-140-5p/TLR4/NF-κB信号传导可能是其治疗UC大鼠的药理机制，本文为UC的临床治疗提供了新的药物候选，有助于其临床治疗技术的改进和患者预后的改善。

参 考 文 献

[1] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571-584.

[2] Sood A, Singh A, Mahajan R, et al. (Re)appraising remission in ulcerative colitis[J]. Inflamm Bowel Dis, 2023, 29(8): 1317-1326.

[3] Guo J, Zhang YY, Sun M, et al. Therapeutic potential of curcumin in a rat model of dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by regulating the balance of treg/Th17 cells[J]. Inflammation, 2022, 45(6):

2163-2171.

[4] Luo RR, Yan ZQ, Yang QL, et al. Inhibition of ssc-microRNA-140-5p ameliorates the *Clostridium perfringens* beta2 toxin-induced inflammatory response in IPEC-J2 cells via the ERK1/2 and JNK pathways by targeting VEGFA[J]. Mol Immunol, 2020, 127: 12-20.

[5] Papathanasiou I, Balis C, Trachana V, et al. The synergistic function of miR-140-5p and miR-146a on TLR4-mediated cytokine secretion in osteoarthritic chondrocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 522(3): 783-791.

[6] Ghasemi-Dehnoo M, Lorigooini Z, Amini-Khoei H, et al. Quinic acid ameliorates ulcerative colitis in rats, through the inhibition of two TLR4-NF-κB and NF-κB-INOS-NO signaling pathways[J]. Immun Inflamm Dis, 2023, 11(8): e926.

[7] Tong LJ, Hao HN, Zhang Z, et al. Milk-derived extracellular vesicles alleviate ulcerative colitis by regulating the gut immunity and reshaping the gut microbiota[J]. Theranostics, 2021, 11(17): 8570-8586.

[8] 常银涛，朱翠玲. 苓桂术甘汤研究新进展及质量标志物预测分析[J]. 中医学报，2023，38(7)：1475-1487.

Chang YT, Zhu CL. Research progress and quality markers prediction analysis of Linggui Zhugan Decoction[J]. Acta Chin Med, 2023, 38(7): 1475-1487.

[9] 翟梦婷，葛瑞瑞，王 翔，等. 苓桂术甘汤对急性心肌梗死后大鼠肠黏膜屏障损伤的保护作用研究[J]. 安徽中医药大学学报，2021，40(2)：66-71.

Zhai MT, Ge RR, Wang X, et al. Protective effect of Linggui Zhugan Decoction against intestinal mucosal barrier injury in rats after acute myocardial infarction[J]. J Anhui Univ Chin Med, 2021, 40(2): 66-71.

[10] 赵陆璐，曲芳萱，陈克研，等. 苓桂术甘汤通过TLR4/Myd88通路改善心衰大鼠心功能[J]. 解剖科学进展，2020，26(4)：404-407，416.

Zhao LL, Qu FX, Chen KY, et al. Lingguizhugan soup improved cardiac function of heart failure rats via TLR4/Myd88 pathway[J]. Prog Anat Sci, 2020, 26(4): 404-407, 416.

[11] 葛柳青，周 峰，王晓兵，等. 金银花提取液通过调控NLRP3/ASC/caspase-信号通路对溃疡性结肠炎大鼠肠道黏膜的影响[J]. 中国免疫学杂志，2022，38(22)：2723-2728.

Ge LQ, Zhou F, Wang XB, et al. Effect of honeysuckle flower extract on intestinal mucosa of rats with ulcerative colitis by regulating NLRP3/ASC/caspase-1 signaling pathway[J]. Chin J Immunol, 2022, 38(22): 2723-2728.

[12] 谢超群，邹君君，张建伟，等. 基于p38MAPK/NF-κB信号通路的穴位埋线对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜上皮屏障的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2022，29(9)：77-83.

Xie CQ, Zou JJ, Zhang JW, et al. Effects of acupoint catgut embedding on intestinal mucosal epithelial barrier in rats with ulcerative colitis based on p38MAPK/NF-κB signaling pathway[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2022, 29(9): 77-83.

[13] Gros B, Kaplan GG. Ulcerative colitis in adults: a review[J]. JAMA, 2023, 330(10): 951-965.

[14] Nakase H. Acute severe ulcerative colitis: optimal strategies for drug therapy[J]. Gut Liver, 2023, 17(1): 49-57.

[15] 张红霞，陈 瑶，赵 鑫，等. 苓桂术甘汤对压力负荷致心衰小鼠心功能、肠道屏障和菌群的影响[J]. 中医药信息，2023，40(2)：23-30.

Zhang HX, Chen Y, Zhao X, et al. Effect of Linggui Zhugan Decoction on intestinal barrier and intestinal flora in mice with pressure overload-induced heart failure[J]. Inf Tradit Chin Med, 2023, 40(2): 23-30.

[16] 李珂熠，刘厚颖，王梦如，等. 加味苓桂术甘汤对肾纤维化大鼠肠道病理的影响[J]. 时珍国医国药，2021，32(8)：1833-1835.

Li KY, Liu HY, Wang MR, et al. Effect of Jiawei Linggui Zhugan Decoction on intestinal pathology in rats with renal fibrosis[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(8): 1833-1835.

[17] Li XY, Zhang HR, Qiao SQ, et al. Melatonin administration alleviates 2, 2, 4, 4-tetra-brominated diphenyl ether (PBDE-47)-induced necroptosis and secretion of inflammatory factors via miR-140-5p/TLR4/NF-κB axis in fish kidney cells[J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 128: 228-237.

[18] Tian L, Fu P, Zhou M, et al. Dandelion sterol improves diabetes mellitus-induced renal injury in *in vitro* and *in vivo* study[J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(9): 5183-5197.

[19] 林晓宇，李 琛，张婷，等. 肝硬化门静脉高压症患者肠壁屏障功能的改变及其与易发感染的关系[J]. 中华肝脏病杂志，2023，31(1)：70-76.

Lin XY, Li C, Zhang T, et al. Changes of intestinal wall barrier function and its correlation with susceptibility to infection in patients with cirrhotic portal hypertension[J]. Chin J Hepatol, 2023, 31(1): 70-76.

[20] Ghasemi-Dehnoo M, Amini-Khoei H, Lorigooini Z, et al. Ferulic acid ameliorates ulcerative colitis in a rat model via the inhibition of two LPS-TLR4-NF-κB and NF-κB-INOS-NO signaling pathways and thus alleviating the inflammatory, oxidative and apoptotic conditions in the colon tissue[J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(5): 2587-2597.

（责任编辑：李青颖）