

β -arrestin1 在实验性大鼠结肠炎发生机制中的作用及氧化苦参碱的干预作用

廖奕 范恒 陈小艳 张丽娟

摘要 **目的** 研究 β -arrestin1 在实验性大鼠结肠炎发生机制中的作用, δ 阿片受体 - β -arrestin1 - Bcl-2 信号转导通路是否参与实验性大鼠结肠炎的病理过程, 氧化苦参碱(OMT)能否通过干预 δ 阿片受体 - β -arrestin1 - Bcl-2 信号转导通路减轻实验性大鼠结肠炎。**方法** 将 26 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 分别为正常对照组 6 只、模型组 6 只、美沙拉嗪组 6 只和 OMT 组 8 只。正常对照组未行造模, 其余 3 组大鼠均采用三硝基苯磺酸(TNBS)造模。OMT 组大鼠给予苦参素注射液肌肉注射, 美沙拉嗪组大鼠给予美沙拉嗪混悬液灌胃, 模型组和正常组大鼠均以蒸馏水 3 mL 灌胃。治疗 15 天, 观察实验大鼠结肠病理组织学改变, 并分别用免疫组化和 Western 免疫印迹技术分别检测实验大鼠结肠黏膜组织和脾脏 T 淋巴细胞 δ 阿片受体、 β -arrestin1 和 Bcl-2 表达变化。**结果** 与正常对照组比较, 模型组 δ 阿片受体、 β -arrestin1 和 Bcl-2 表达明显增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 美沙拉嗪组和 OMT 组 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 表达均显著下降 ($P < 0.01$)。**结论** δ 阿片受体 - β -arrestin1 - Bcl-2 信号转导通路参与 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎的发病机制; OMT 抑制 δ 阿片受体 - β -arrestin1 - Bcl-2 信号转导通路, 是 OMT 改善 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎的机制之一。

关键词 δ 阿片受体; β -arrestin1; Bcl-2; 信号转导; CD_4^+ T 细胞; TNBS 诱导的结肠炎; 氧化苦参碱

Pathogenetic Mechanism of β -arrestin1 In Experimental Colitis of Rats and Intervention Effects of Oxymatrine LIAO Yi, FAN Heng, CHEN Xiao-yan, et al *Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430022)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the pathogenetic mechanism of β -arrestin1 in the rat's experimental colitis, whether the δ opioid receptor- β -arrestin1-Bcl-2 signal transduction pathway involves the pathological process of experimental colitis in rats, and whether oxymatrine could attenuate colitis through this pathway. **Methods** Twenty-six SD rats were randomly divided into four groups, the normal control group, the model group, the mesalazine treated group and the oxymatrine treated group (8 rats in the last group and 6 each in the others). The colitis model was established with trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), and rats in the latter two groups were treated by oxymatrine (intramuscular injection) and mesalazine (3 mL solution gavaged) for 15 days, respectively, while rats in the former two groups were fed with equal volume of distilled water. Symptoms of diarrhea and bloody stool as well as colonic patho-histologic changes were observed, and changes in expressions of δ opioid receptor, β -arrestin1 and Bcl-2 in rat's colon tissue and spleen T lymphocytes were detected with immuno-histochemistry and Western immuno-blotting techniques, respectively. **Results** In contrast to the normal control group, expressions of δ opioid receptor, β -arrestin1 and Bcl-2 were significantly higher in the model group ($P < 0.01$); compared with the model group, they were significantly lower in the two treated groups ($P < 0.01$). **Conclusions** δ opioid receptor- β -arrestin1-Bcl-2 signal transduction pathway participates in the pathogenesis of TNBS-induced experimental colitis in rats. Oxymatrine can intervene the signal transduction, which may be one of the mechanisms of oxymatrine in attenuating colitis in rats.

KEYWORDS δ -opioid receptor; β -arrestin1; Bcl-2; signal transduction; CD_4^+ T cell; trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis; oxymatrine

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30772878)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科(武汉 430022)

通讯作者:范恒, Tel: 027-85726395, E-mail: fanheng009@yahoo.com.cn

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是特发性慢性肠道炎症,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),其病因和发病机制尚不明确,可能与环境、遗传、肠道黏膜免疫功能失调等多种因素有关。多种基因改变导致肠道黏膜屏障功能缺陷和肠道黏膜免疫功能失调,在某些环境因素的作用下触发了由肠道黏膜效应性 T 细胞介导的对肠道正常抗原物质的过度免疫反应,导致炎症性肠病发生,为免疫异常性疾病^[1,2]。炎症性肠病患者的肠黏膜效应性 CD₄⁺ T 细胞的过度活化和凋亡缺陷,导致肠道黏膜免疫稳态的丧失^[3-5]。诱导效应性 CD₄⁺ T 细胞凋亡,清除过度活化的效应性 CD₄⁺ T 细胞,能恢复肠道黏膜免疫稳态,减轻炎症性肠病的慢性肠道炎症^[6,7]。 β -arrestin1 参与调节细胞的增殖、凋亡和活化过程,可以促进 CD₄⁺ T 细胞的活化和抑制其凋亡^[8-11]。氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)具有抗炎和免疫调节功能,能有效的治疗炎症性肠病^[12,13]。我们通过建立三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的实验性大鼠结肠炎模型,研究 β -arrestin1 在炎症性肠病病理机制中的作用,结果表明 δ 阿片受体 - β -arrestin1 - Bcl-2 信号转导通路参与 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎的病理过程;OMT 通过抑制 δ 阿片受体 - β -arrestin1 - Bcl-2 信号转导通路的活化,减轻实验性大鼠结肠炎。

材料与方法

1 材料 雄性 SD 大鼠 26 只,SPF 级,体重(250 $\pm$ 20)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证 SCKY(鄂)2004-0007 和使用许可证 SYXK(鄂)2004-0028;三硝基苯磺酸(TNBS, Sigma 公司); δ 阿片受体多克隆抗体(Arcis 公司, BP2145); β -arrestin1 多克隆抗体(Abcam 公司, AB32099);Bcl-2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司, sc-492);迈新公司免疫组化试剂盒(KIT-5020, 羊抗鼠/兔);大鼠淋巴细胞分离液(武汉博士德, CM0100);RIPA 细胞/组织总蛋白提取液(ProMab, Cat. No. SJ-200501);Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所, Cat. No. P0006);美沙拉嗪(法国爱的发制药集团),规格 500 mg $\times$ 10 袋/盒;苦参素注射液(江苏鹏鹞药业有限公司),规格:0.2 g/2 mL,主要成分为苦参素,即 OMT。

2 方法

2.1 动物分组 健康雄性 SD 大鼠 26 只随机分为 4 组,其中正常对照(正常)组 6 只,模型组 6 只,美沙拉嗪组 6 只,OMT 组 8 只,各组体质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 模型建立 采用 TNBS 造模,依据 Morris 等^[14]提出的方法操作如下:SD 大鼠禁食不禁水 24 h 后,用 10% 水合氯醛按每 100 g 体重 0.3 mL 腹腔注射麻醉,麻醉后将内径 2 mm 的橡胶导尿管由肛门经缓慢插入约 8 cm,将 0.6 mL 的 5% TNBS 液(溶于 50% 乙醇中)用注射器缓慢推入橡胶导尿管,推入 TNBS 液后将大鼠尾巴提起,持续倒置 30 s,防止药液流出。造模结束后让动物平躺,待其自然清醒,给予自由饮食。

2.3 药物干预和处死 OMT 组每只大鼠采用苦参素注射液 63 mg/(kg $\cdot$ d)肌肉注射,每天 1 次,连续 15 天。美沙拉嗪组每只大鼠采用美沙拉嗪 0.5 g/(kg $\cdot$ d)的蒸馏水溶液 3 mL 灌胃,每天 1 次,连续 15 天;模型组、正常组每只大鼠均以蒸馏水 3 mL 灌胃,每天 1 次,连续 15 天。4 组实验大鼠于第 16 天禁食 24 h 后将大鼠颈椎脱臼处死。

2.4 大鼠脾脏 T 细胞分离和蛋白质提取 将处死的大鼠置于 70% 乙醇中浸泡 3 ~ 5 min,取出后在超净工作台无菌取出脾脏,将脾脏置于盛有无小牛血清的 RPMI-1640 不完全培养液的培养皿中清洗干净,200 目不锈钢金属网上,用 10 mL 注射器针柄轻柔研磨脾脏至留下白色纤维包膜组织,收集网下的细胞悬液,与 Hank's 液 1:1 混匀后,小心加于 2 mL 的大鼠淋巴细胞分离液的液面上,置离心机中,2 000 r/min,室温离心 20 min,收集界面上的细胞,放入含 Hank's 液 5 mL 的试管中,充分混匀后,以 2 000 r/min 离心 10 min,吸去上清液,沉淀,再用无小牛血清的 RPMI-1640 不完全培养液冲洗两次并重新悬浮为脾脏淋巴细胞悬液,尼龙棉柱法分离 T 细胞^[15]。收集分离的 T 细胞悬液置于 EP 管中,用 RIPA 细胞/组织总蛋白提取液裂解细胞提取总蛋白,在收集的 T 细胞悬液中加入 1 mL RIPA 后充分吹打,然后置冰上 20 min,再吹打 20 min,将匀浆液吸出放到 1.5 mL 离心管中,超声 3 次破碎细胞,每次 3 s,再 9 000 r/min 离心 10 min,用移液管将富含蛋白质的上清液转移到样品管中, -70 $^{\circ}$ C 存放备用。

2.5 大鼠结肠黏膜组织 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 表达 处死大鼠取出脾脏后,剖腹暴露腹腔,切取肛门至回盲部的结肠,取出结肠后沿纵轴切开,并用生理盐水冲洗干净,观察大鼠结肠的大体病变情况,然后将大鼠结肠置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,在显微镜下观察评估大鼠结肠黏膜损伤程度。采用免疫组织化学法检测 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 表达,按迈新公司免疫组化试剂盒(KIT-5020)说明书进行操作:常规包埋,切片,厚度 3 μ m,60 ~ 65 $^{\circ}$ C 烤片 4 h。切片脱蜡和水化。1 $\times$ PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2)洗涤切片 3 $\times$ 5 min。高压抗原修复,取出

抗原修复盒,待修复液自然冷却,30 min。3%过氧化氢去离子水室温孵育 10 min,蒸馏水冲洗。PBS 浸洗 3×5 min。滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 15 min,甩去多余液体。分别按稀释度 1:500 滴加兔抗鼠 δ 阿片受体多克隆抗体、1:200 滴加兔抗鼠 β -arrestin1 多克隆抗体、1:200 滴加兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体,各 50 μ L,置于湿盒内,4℃过夜,防止切片干燥。1×PBS 洗 3 次各 5 min。滴加复合生物素标记的二抗 (HRP-Polymer anti ms/rb IgG),室温孵育 20 min。DAB 显色,在显微镜下控制显色程度,蒸馏水终止显色反应。苏木素复染,30~60 s。脱水,透明,中性树胶封片。在显微镜下观察免疫组化结果,并用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行图像分析,以黄色或棕黄色染色为阳性表达,测定平均光密度值。

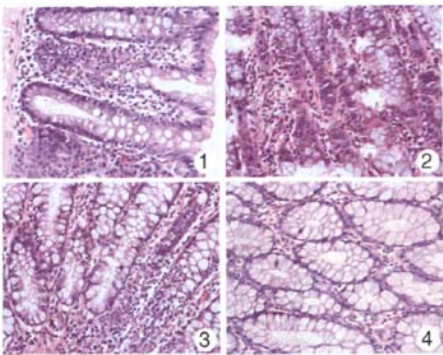
2.6 脾脏 T 淋巴细胞 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 蛋白表达 采用 Western 免疫印迹法检测。用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度;SDS-PAGE 电泳;免疫印迹转膜;免疫检测;化学发光,压片,显影,定影。阳性条带以 Gel pro4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析,测 IOD 值。

3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和多个样本均数间比较的 SNK-*q* 检验。

结 果

1 实验大鼠结肠的肉眼和镜下组织病理学改变 正常对照组大鼠结肠黏膜纹理清晰,无黏膜充血水肿,未见黏膜糜烂和溃疡。模型组大鼠结肠肠管明显变粗,肠壁增厚,由肛门至回盲部的肠管长度变短,纵行切开病变肠管可见由肛门约 3 cm 以上至回盲部结肠黏膜可见多处片状充血、水肿、糜烂、浅表或线状溃疡和瘢痕组织形成,并伴有局部结肠肠腔的扩张,严重的出现肠壁间渗出和粘连。与模型组比较,美沙拉嗪组和 OMT 组大鼠结肠黏膜组织病理改变明显减轻,充血、水肿、糜烂和溃疡面积明显缩小,溃疡较浅表,肠壁增厚较模型组轻,未见肠壁粘连。实验大鼠病变结肠组织切片后常规 HE 染色,光学显微镜下观察可见:正常对照组大鼠结肠黏膜结构完整,黏膜腺体排列整齐清晰,黏膜内血管基质正常,无充血水肿、溃疡形成和炎性细胞浸润(图 1-1)。模型组大鼠结肠黏膜结构异常,黏膜腺体破坏,排列不规则,杯状细胞减少,黏膜和黏膜下固有层明显充血水肿,可见黏膜局灶糜烂和溃疡,在黏膜及黏膜下固有层可见大量炎性细胞浸润(图 1-2)。美沙拉嗪组和 OMT 组大鼠结肠黏膜结构尚完整,黏膜和黏膜下固有层充血、水肿较轻,溃疡较浅表,腺体增生活

跃,杯状细胞增多,炎性细胞浸润减轻(图 1-3,4)。



注:①正常组,②模型组,③美沙拉嗪组,④OMT 组
图 1 各组大鼠结肠黏膜组织病理变化 (HE, ×100)

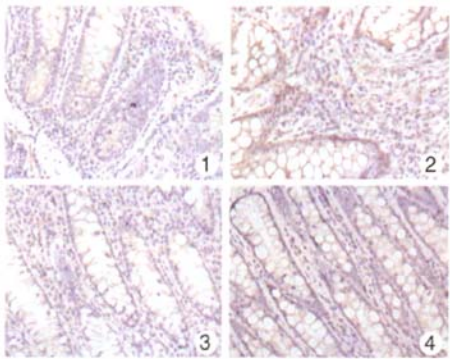
2 各组大鼠结肠黏膜组织 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 阳性表达(表 1) 在光学显微镜下观察大鼠结肠黏膜组织免疫组化切片,可见大鼠结肠黏膜组织 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 主要表达于上皮细胞和间质淋巴细胞。正常组结肠黏膜组织内少量细胞的胞质内可见浅黄色颗粒(图 2-1,图 3-1,图 4-1),模型组上皮细胞和淋巴细胞的胞质和胞核内均可见多量深棕黄色或褐色颗粒(图 2-2,图 3-2,图 4-2),美沙拉嗪组和 OMT 组上皮细胞和淋巴细胞的胞质和胞核内可见少量黄色颗粒(图 2-3、4,图 3-3、4,图 4-3、4)。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件定量分析大鼠结肠黏膜组织免疫组化切片 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 的表达,结果表明:与正常组比较,模型组结肠黏膜组织 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 阳性表达均显著上升($P < 0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组和 OMT 组结肠黏膜组织 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 阳性表达均显著下降($P < 0.01$),但美沙拉嗪组和 OMT 组之间比较 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 阳性表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 大鼠结肠组织 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 表达 ($\bar{x} \pm s$)

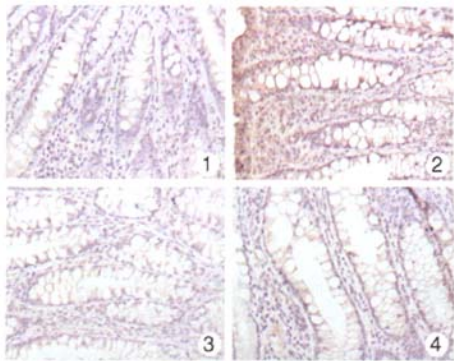
组别	<i>n</i>	δ 阿片受体	β -arrestin1	Bcl-2
正常	6	18.85 $\pm$ 5.18	24.15 $\pm$ 5.15	25.18 $\pm$ 7.07
模型	6	76.54 $\pm$ 7.57*	80.13 $\pm$ 5.89*	77.22 $\pm$ 11.14*
美沙拉嗪	6	24.65 $\pm$ 7.43 Δ	30.43 $\pm$ 5.70 Δ	29.55 $\pm$ 7.72 Δ
OMT	8	24.65 $\pm$ 7.47 Δ	29.41 $\pm$ 8.80 Δ	28.54 $\pm$ 8.34 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

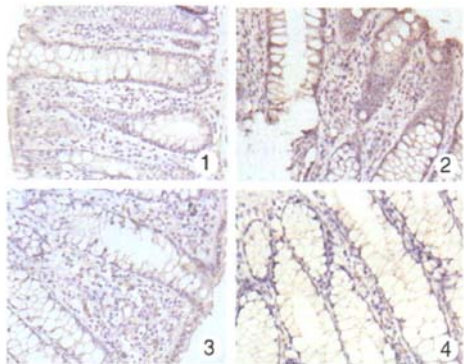
3 各组大鼠脾脏 T 淋巴细胞 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 表达(表 2) 与正常对照组比较,模型组脾脏 T 淋巴细胞 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 蛋白表达水平均显著上升($P < 0.01$);与模型组比较,美沙拉嗪组和 OMT 组脾脏 T 淋巴细胞 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 蛋白表达水平均显著下降($P < 0.01$),但美



注：①正常组，②模型组，③美沙拉嗪组，④OMT 组
图 2 各组大鼠结肠黏膜组织 δ 阿片受体表达



注：①正常组，②模型组，③美沙拉嗪组，④OMT 组
图 3 各组大鼠结肠黏膜组织 β -arrestin1 表达



注：①正常组，②模型组，③美沙拉嗪组，④OMT 组
图 4 各组大鼠结肠黏膜组织 Bcl-2 表达

表 2 大鼠脾脏 T 细胞 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	δ 阿片受体	β -arrestin1	Bcl-2
正常	6	113.07 $\pm$ 9.05	114.44 $\pm$ 19.39	133.90 $\pm$ 12.18
模型	6	279.30 $\pm$ 15.96*	306.12 $\pm$ 25.55*	268.44 $\pm$ 31.42*
美沙拉嗪	6	155.23 $\pm$ 8.37 Δ	152.70 $\pm$ 23.18 Δ	166.18 $\pm$ 26.44 Δ
OMT	8	146.01 $\pm$ 8.89 Δ	146.76 $\pm$ 10.56 Δ	159.30 $\pm$ 30.35 Δ

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.01$

沙拉嗪组和 OMT 组之间比较 δ 阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

1 TNBS 诱导的大鼠结肠炎模型 β -arrestin1 过度表达促进效应性 T 细胞的过度活化，是 TNBS 诱导的大鼠结肠炎的重要发病机制之一。效应性 CD_4^+ T 细胞在肠黏膜的聚集和过度活化是炎症性肠病发生、持续和慢性化的重要机制之一，抑制效应性 CD_4^+ T 细胞的过度活化是治疗炎症性肠病的重要手段^[16]。 β -arrestin1 可以参与 T 细胞的活化过程，T 细胞受体 (TCR) 信号提高了的 T 细胞免疫突触结构中的 cAMP 水平，通过 cAMP-PKA-Csk 抑制性信号通路抑制 T 细胞受体信号对 T 细胞的活化，这种反馈性抑制作用使 T 细胞不能完全活化。而 TCR/ CD_{28} 共刺激信号能将 PDE4/ β -arrestin 复合物募集到 T 细胞免疫突触结构中，使 cAMP 降解，继而下调 cAMP-PKA-Csk 抑制性信号对 T 细胞活化的抑制作用，促进 T 细胞的活化^[9,10]。我们的研究表明在 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎模型中结肠黏膜组织和脾脏 T 细胞的 β -arrestin1 表达与正常对照组大鼠相比明显增加 ($P < 0.01$)，说明过度表达的 β -arrestin1 可以通过促进效应性 T 细胞的过度活化，导致肠道黏膜免疫稳态的丧失，参与 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎的病理过程。

2 TNBS 诱导的大鼠结肠炎模型 δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2 信号转导通路的过度活化参与 TNBS 诱导的大鼠结肠炎的病理过程。 CD_4^+ T 淋巴细胞的凋亡在调节黏膜免疫平衡中扮演着中枢性的角色，黏膜免疫稳态的维持依赖黏膜 T 细胞增殖和凋亡之间的平衡， CD_4^+ T 淋巴细胞的凋亡缺陷是炎症性肠病的肠道炎症发生的重要因素之一，活化的效应性 CD_4^+ T 细胞在肠道黏膜的不适当的聚集导致肠道炎症的持续和慢性化^[17-19]。在 CD 患者的肠黏膜组织中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的比率 (Bcl-2/Bax) 升高，使肠黏膜 T 细胞对凋亡信号的抵抗增强^[19-21]。UC 患者 T 细胞存在凋亡缺陷，UC 患者肠黏膜固有层 T 细胞高表达诱饵受体 (decoy receptors) DcR1、DcR2 和 DcR3，抵抗 TCR 受体复合物活化介导的细胞凋亡信号；UC 患者 T 细胞对死亡受体 (Fas) 介导的细胞凋亡信号敏感性降低，半胱天冬氨酸酶 8 (casapases8) 的抑制蛋白 FLIP 表达显著增加，降低了死亡受体 (Fas) 介导的 T 细胞凋亡信号^[19,22]。促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-12 可以通过多种途径抑制炎症性肠病患者 T 细胞的凋亡，膜结合 TNF 与 TNF 受体 (TNFR2) 结合通过活化 NF- κ B 和 MAPK 信号通路抑制 T 细胞凋亡信号。IL-12 通过抑制半胱天冬氨酸酶 3 和 9 (casapases3 和

casapases9) 活性,抑制依赖死亡受体 Fas 信号介导的 T 细胞凋亡。IL-6 与 IL-6 可溶性受体 (sIL-6R) 复合物 IL-6/sIL-6R 与 IBD 患者肠黏膜固有层 CD₄⁺ T 细胞膜 gp130 分子结合,诱导 CD₄⁺ T 细胞内转录因子 STAT3 的活化,活化的 STAT3 诱导抗凋亡基因 Bcl-2 和 Bcl-XL 的表达,抑制 T 细胞凋亡^[6,23]。

激活 δ 阿片受体能诱导 β -arrestin1 向细胞核内转移,核内的 β -arrestin1 募集组蛋白乙酰化酶 p300 到基因 p27, c-Fos 的启动子序列,增强启动子序列局部组蛋白 H4 乙酰化,促进基因的转录^[24]。 β -arrestin 能阻断 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 介导的凋亡信号^[25], T 细胞活化的 CD 28 共刺激信号诱导 T 细胞表达 δ 阿片受体^[26],活化的 δ 阿片受体信号能诱导 CD₄⁺ T 细胞浆内的 β -arrestin1 向细胞核内转移,进入细胞核内的 β -arrestin1 募集组蛋白乙酰化酶 p300,增强 Bcl-2 编码基因的启动子序列区域组蛋白 H4 乙酰化和 Bcl-2 基因转录,促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。Bcl-2 通过阻断细胞的线粒体凋亡途径中细胞色素 C 的释放和半胱天冬氨酸酶 (caspase) 的活化过程抑制 CD₄⁺ T 细胞凋亡。Arrb1^{-/-}小鼠 CD₄⁺ T 细胞与野生型小鼠 CD₄⁺ T 细胞相比 Bcl-2 mRNA 水平明显降低,生存率降低。 β -arrestin1 参与抑制 CD₄⁺ T 细胞凋亡,在自身免疫性疾病的发生和维持中具有重要的作用^[11,27]。我们的研究表明 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎结肠组织和脾脏 T 细胞中 δ 阿片受体、 β -arrestin1 和 Bcl-2 的表达均增强,说明 δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl2 信号转导通路参与 TNBS 诱导的大鼠结肠炎的病理过程, δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2 信号转导通路可能是通过促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制 CD₄⁺ T 细胞凋亡,使效应性 T 细胞在肠道黏膜过度聚集,导致肠道炎症的发生。 δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2 信号转导通路的活化可能是导致炎症性肠病发生的重要病理机制之一。

3 OMT 可以通过抑制 δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2 信号转导通路活化,促进效应性 T 细胞凋亡,抑制效应性 T 细胞的活化,减轻 TNBS 诱导的大鼠结肠炎的症状和组织病理改变诱导效应性 T 细胞的凋亡是治疗炎症性肠病的重要手段^[28,29]。TNF- α 的抗体英夫利昔单抗 (infliximab) 能抑制膜结合 TNF/TNFR2 信号通路和直接诱导 casapases 及促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 而诱导 T 细胞凋亡,并通过诱导活化的肠黏膜 T 细胞的凋亡治疗炎症性肠病^[6,30]。OMT 是喹啉类生物碱,具有细胞毒性作用和抗炎免疫调节功能,能通过抑制 NF- κ B 活性和降低促炎细胞因子的表达减轻实验性大鼠结肠炎^[12,13]。OMT 可以下调 Bcl-2

和 Bcl-XL 的表达,上调 Bax 和 p53 的表达,提高 Bax/Bcl-2 比率,增强半胱天冬氨酸酶 3 (caspase-3) 活性,促进细胞凋亡^[31,32]。我们的研究表明 OMT 能显著改善 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎模型结肠组织的病理组织学改变,降低 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎结肠组织和脾脏 T 细胞中 δ 阿片受体、 β -arrestin1 和 Bcl-2 的表达,说明 OMT 可以通过抑制 TNBS 诱导的大鼠结肠炎模型 δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2 信号转导通路的活化,促进效应性 T 细胞的凋亡,清除结肠黏膜过度聚集的效应性 T 细胞。 β -arrestin1 参与 T 细胞的活化过程^[9,10],模型组与 OMT 组 β -arrestin1 表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),OMT 还可以抑制 TNBS 诱导的大鼠结肠炎模型中 T 细胞 β -arrestin1 的过度表达,抑制 TNBS 诱导的大鼠结肠炎效应性 T 细胞的过度活化。通过上述机制,OMT 可能促进效应性 T 细胞凋亡和抑制效应性 T 细胞的过度活化,从而减轻 TNBS 诱导的大鼠结肠炎的症状和组织病理改变。

总之, δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl2 信号转导通路可能通过抑制 T 细胞凋亡和促进 T 细胞活化参与 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎的发病机制。OMT 抑制 δ 阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2 信号转导通路,促进效应性 T 细胞凋亡和抑制效应性 T 细胞活化,是 OMT 改善实验性大鼠结肠炎可能机制之一。本研究结果为 OMT 治疗炎症性肠病提供了新的理论依据和思路。

参 考 文 献

- [1] Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology [J]. Lancet, 2007, 369 (9573):1627-1640.
- [2] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Nature, 2007, 448 (7152):427-434.
- [3] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(7):521-533.
- [4] Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, et al. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies [J]. Inflamm Bowel Dis, 2006, 12 (11): 1068-1083.
- [5] Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease [J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102 (9): 2058-2069.
- [6] Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications [J]. Gut, 2007, 56(2):293-303.

- [7] Neurath MF, Finotto S, Fuss I, et al. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(1):21-26.
- [8] Gurevich VV, Gurevich EV, Cleghorn WM. Arrestins as multi-functional signaling adaptors [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, (186):15-37.
- [9] Taskén K, Stokka AJ. The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells [J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 4):476-479.
- [10] Abrahamsen H, Baillie G, Ngai J, et al. TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling [J]. *J Immunol*, 2004, 173(8):4847-4858.
- [11] Frederick TJ, Miller SD. Arresting autoimmunity by blocking beta-arrestin 1 [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(8):791-2.
- [12] Fan H, Chen R, Shen L, et al. Oxymatrine improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting the expression of NF- κ B p65 [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol (Med Sci)*, 2008, 28(4):415-420.
- [13] Zheng P, Niu FL, Liu WZ, et al. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(31):4912-4915.
- [14] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3):795-803.
- [15] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 433-435.
Shen GX, Zhou RL, editors. *Experimental techniques of modern immunology* [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2002:433-435.
- [16] Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease [J]. *Immunity*, 2009, 31(3):389-400.
- [17] Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, et al. Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system [J]. *J Immunol*, 2001, 166(10):6399-6403.
- [18] Mudter J, Neurath MF. Mucosal T cells: mediators or guardians of inflammatory bowel disease? [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2003, 19(4):343-349.
- [19] Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2004, 53(11):1556-1558.
- [20] Itoh J, de La Motte C, Strong SA, et al. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease [J]. *Gut*, 2001, 49(1):35-41.
- [21] Ina K, Itoh J, Fukushima K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance [J]. *J Immunol*, 1999, 163(2):1081-1090.
- [22] Fayad R, Brand MI, Stone D, et al. Apoptosis resistance in ulcerative colitis: high expression of decoy receptors by lamina propria T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(8):2215-2222.
- [23] Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13(8):1016-1023.
- [24] Kang J, Shi Y, Xiang B, et al. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription [J]. *Cell*, 2005, 123(5):833-847.
- [25] Revankar CM, Vines CM, Cimino DF, et al. Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(23):24578-24584.
- [26] Nguyen K, Miller BC. CD28 costimulation induces delta opioid receptor expression during anti-CD3 activation of T cells [J]. *J Immunol*, 2002, 168(9):4440-4445.
- [27] Shi Y, Feng Y, Kang J, et al. Critical regulation of CD4⁺ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1 [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(8):817-824.
- [28] Verstege MI, te Velde AA, Hommes DW. Apoptosis as a therapeutic paradigm in inflammatory bowel diseases [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2006, 69(4):406-412.
- [29] Lügering A, Lebedez P, Koch S, et al. Apoptosis as a therapeutic tool in IBD [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1072:62-77.
- [30] Sturm A, Fiocchi C. Life and death in the gut: more killing, less Crohn's [J]. *Gut*, 2002, 50(2):148-149.
- [31] 侯颖, 曹蔚, 李涛, 等. 氧化苦参碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的可能机制 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(6):634-638.
Hou Y, Cao W, Li T, et al. Oxymatrine-induced apoptosis of HepG2 cells: the possible mechanism [J]. *Acad J Second Milit Med Univ*, 2008, 29(6):634-638.
- [32] 秦学功, 尹继云, 张华. 氧化苦参碱抑制 HepG₂ 细胞增殖的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(11):1426-1429.
Qin XG, Yin JY, Zhang H. Effects of oxymatrine on proliferation of HepG2 cells [J]. *China J Chin Mater Med*, 2009, 34(11):1426-1429.

(收稿:2010-02-10 修回:2010-07-13)