

## · 基础研究 ·

## 解毒活血方灌肠对溃疡性结肠炎小鼠 TLR4 相关通路蛋白及炎症因子表达的影响

王建云<sup>1</sup> 江海燕<sup>1</sup> 刘果<sup>2</sup> 刘元<sup>1</sup> 刘畅<sup>1</sup> 张强<sup>1</sup> 黄钰淇<sup>2</sup>

**摘要 目的** 探讨解毒活血方灌肠治疗对溃疡性结肠炎(UC)小鼠 Toll 样受体 4 (TLR4)、 $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TRIF)、干扰素调节因子 3 (IRF3) 通路蛋白及相关炎症因子表达的影响。**方法** 雄性 C57BL/6 小鼠 80 只,根据随机数字表法分为中药组、西药组、模型组和空白组,每组 20 只。中药组、西药组、模型组小鼠饮用 3% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 溶液 7 天,空白组小鼠正常饮水。造模成功后中药组以 12.24 g/kg 中药蒸馏水混悬液灌肠,西药组给予 1.33 g/kg 美沙拉秦灌肠剂灌肠,模型组、空白组给予等量生理盐水灌肠,每天 1 次,连续给药 7 天。记录小鼠体重、粪便性状及便血情况,计算疾病活动指数 (DAI),检测血清白细胞介素 18 (IL-18)、白细胞介素 10 (IL-10) 含量,采用 Western Blot 检测结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 通路蛋白表达及实时荧光定量 PCR 法检测 mRNA 水平。**结果** 与空白组比较,模型组 DAI 升高 ( $P<0.01$ ),血清 IL-10 降低 ( $P<0.01$ ),IL-18 升高 ( $P<0.01$ ),结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白及 mRNA 表达升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,西药组、中药组结肠病理改善,DAI 降低 ( $P<0.01$ ),血清 IL-10 升高 ( $P<0.01$ ),中药组 IL-18 降低 ( $P<0.01$ ),西药组 TLR4 蛋白、中药组 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ),西药组、中药组 TLR4、TRIF、IRF3 mRNA 表达降低 ( $P<0.01$ );与西药组比较,中药组结肠病理改善,DAI 降低 ( $P<0.01$ ),血清 IL-10 升高 ( $P<0.01$ ),IL-18 降低 ( $P<0.05$ ),中药组 TLR4、IRF3 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ),TLR4、IRF3 mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ )。**结论** 解毒活血灌肠方可下调 TLR4、TRIF、IRF3 信号通路,抑制促炎因子释放,增加抗炎因子水平,从而减轻肠道炎症反应,促进结肠黏膜修复。

**关键词** 溃疡性结肠炎;解毒活血方;TLR4/TRIF/IRF3 信号通路;白介素 -10;白介素 -18

**Effects of Jiedu Huoxue Recipe Enema on Expressions of TLR4 Related Signal Pathway Proteins and Inflammatory Factors in Ulcerative Colitis Mice** WANG Jian-yun<sup>1</sup>, JIANG Hai-yan<sup>1</sup>, LIU Guo<sup>2</sup>, LIU Yuan<sup>1</sup>, LIU Chang<sup>1</sup>, ZHANG Qiang<sup>1</sup>, and HUANG Zheng-qi<sup>2</sup> *1 Department of Gastroenterology, Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 Collage of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)*

**ABSTRACT Objective** To observe the effect of Jiedu Huoxue Recipe (JDHXR) enema on expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4) /TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (TRIF) /interferon regulatory factor 3 (IRF3) signal pathway proteins and related inflammatory factors in mice with ulcerative colitis (UC).

**Methods** Eighty male C57BL/6 mice were divided into Chinese medicine group, Western medicine group, model group, and blank group by random digit table, 20 mice in each group. Mice in Chinese medicine group, Western medicine group, and blank group were administered with 3% sodium dextran sulfate (DSS) solution for 7 days, while mice in blank group drank water normally. After successful modeling, mice in Chinese medicine group were given 12.24 g/kg JDHXR enema. Those in Western medicine group were given 1.33 g/kg Mesalachin enema. And mice in the model group and the blank group were given the same amount of normal saline enema.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81873214);北京中医药大学基本科研业务费青年教师项目(No.2019JYBJS179)

作者单位:1.北京中医药大学第三附属医院脾胃科(北京 100029);2.北京中医药大学中医学院(北京 100029)

通讯作者:刘果, Tel: 010-64286998, E-mail: liuguo83@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210626.176

All medication was performed once per day for 7 consecutive days. Body weight, fecal traits, and blood in stool of mice were recorded to calculate daily activity index (DAI). The levels of serum IL-18 and IL-10 and mRNA and protein expression levels of TLR4, TRIF, and IRF3 pathways in colon tissues were detected by Western Blot and real time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with the blank group, DAI of model group increased ( $P<0.01$ ), serum IL-10 decreased ( $P<0.01$ ), IL-18 increased ( $P<0.01$ ), protein and mRNA expressions of TLR4, TRIF, and IRF3 in colon tissue increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the pathological colon conditions were improved, DAI decreased ( $P<0.01$ ), and serum levels of IL-10 increased ( $P<0.01$ ) in Western medicine and Chinese medicine group. IL-18 decreased ( $P<0.01$ ) in Chinese medicine group. TLR4 protein decreased ( $P<0.01$ ) in Western medicine group. The expressions of TLR4, TRIF, and IRF3 protein decreased ( $P<0.01$ ) in Chinese medicine group. mRNA expressions of TLR4, TRIF, IRF3 decreased in both Western medicine and Chinese medicine group ( $P<0.01$ ). Compared with Western medicine group, colon pathologies were improved, DAI decreased ( $P<0.01$ ), serum IL-10 increased ( $P<0.01$ ), IL-18 decreased ( $P<0.05$ ), protein expressions of TLR4 and IRF3 decreased ( $P<0.05$ ), and mRNA expressions of TLR4 and IRF3 decreased ( $P<0.05$ ) in Chinese medicine group. **Conclusion** JDHXD enema down-regulated TLR4, TRIF, and IRF3 signaling pathways, inhibited the release of pro-inflammatory factors, and increased the levels of anti-inflammatory factors, so as to reduce intestinal inflammatory response and promote colon mucosal repair.

**KEYWORDS** ulcerative colitis; Jiedu Huoxue Recipe; TLR4/TRIF/IRF3 signal pathway; IL-10; IL-18

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以黏液脓血便, 里急后重及腹痛为主要表现的慢性复发性肠道炎症性疾病。近年来, 我国 UC 的发病率曾逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。本病治疗周期长, 成本较高, 且迁延不愈的 UC 还有发展为结肠癌的风险<sup>[2]</sup>。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 及下游的  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ , TRIF) 通过调控信号分子干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 影响适应性免疫应答, 介导机体的免疫应答及炎症反应, 在内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 UC 炎症反应中起了重要作用<sup>[3]</sup>。本课题组根据 UC “毒损肠络” 的病机特点, 采用解毒活血方灌肠配合中药口服治疗能迅速提高疗效, 缩短病程, 减少复发, 优于西药常规治疗<sup>[4]</sup>。本研究拟通过葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 建立 UC 小鼠模型, 从 TLR4/TRIF/IRF3 信号通路进一步明确解毒活血方治疗 UC 的分子机制。

### 材料与方

1 动物 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 80 只, 体重 20~22 g, 鼠龄 7 周, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物合格证号: SCXK (京) 2019-0010。于北京中医药大学动物实验中心动物房饲养, 温度 23~27 °C, 相对湿度 45%, 室内通风良好, 每日光照 12 h, 适应性饲养 1 周。本研究经北京中

药大学动物实验伦理委员会审核通过 (No.BUCM-4-2018101701-4007), 实验方案符合公平性、安全性原则, 实验动物符合国家对实验动物相关要求。

2 药物 解毒活血方中药由北京中医药大学第三附属医院中药房制备。药物组成: 黄连 10 g 黄芩 10 g 苦参 10 g 五倍子 10 g 三七粉 3 g。药物制备成颗粒剂, 加蒸馏水煎煮后浓缩成灌肠液, 药液浓度为含生药 0.612 g/mL, 灭菌分装后于 4 °C 冰箱保存。

3 试剂与仪器 DSS (美国 MP Biomedicals 公司生产, 规格: 100g/瓶, 批号: 0216011080); 美沙拉嗪灌肠液 (德国 Dr.Falk Pharma GmbH 公司生产, 规格: 4 g/支, 批号: H20150127)。小鼠 IL-10、IL-18 酶联免疫吸附法检测试剂盒 [瑞博奥 (广州) 生物科技股份有限公司, 批号分别为: DS-MB-02649、DS-MB-12766]; 兔抗鼠 TLR4 (美国 Proteintech 公司, 批号: 19811-1-AP); 兔抗鼠 TRIF (美国 Proteintech 公司, 批号: 23288-1-AP); 兔抗鼠 IRF3 (美国 Proteintech 公司, 批号: 11312-1-AP); Trizol TM Reagent 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596026); PCR 引物 [生工生物工程 (上海) 有限公司]; M-MLV 反转录试剂盒 (Promega 公司); Real-time PCR 扩增试剂盒 (Qiagen 公司); Agarose (Promega 公司); DEPC (Sigma 公司); Powerpac HQ 稳压稳流电泳仪、MP3 垂直电泳槽、Trans-Blot SD 半干转电转印仪 (美国 Bio-Rad 公司); MR 23i 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司); BS224S 电子天平 (德国 Sartorius 公司);

Biophotometer 紫外分光光度计 (德国 Eppendorf 公司); 7500 fast Real-Time PCR 仪 (美国 ABI 公司); 梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 数码凝胶成像系统 (BINTA 公司)。

#### 4 方法

**4.1 造模与干预方法** 80 只小鼠根据随机数字表法分为空白组、模型组、西药组、中药组, 每组 20 只。空白组小鼠给予 SPF 级动物标准饮食喂养。其余 60 只小鼠自由饮用蒸馏水配置的 3% DSS 溶液, 连续 7 天, 制备 UC 小鼠模型<sup>[5]</sup>。小鼠逐渐出现大便次数增多伴脓血, 体重下降、进食减少等表现, 造模第 7 天随机抽取 2 只模型组进行结肠病理检查, 判断造模成功与否。造模 7 天后, 所有小鼠均造模成功, 无小鼠死亡, 造模成功率为 100%。小鼠于造模成功后各组动物给予灌肠处理, 每天 1 次, 连续 7 天。根据小鼠体重换算灌肠剂量为 12.24 g/kg, 中药组给予解毒活血方混悬液灌肠, 西药组给予美沙拉秦灌肠剂 1.33 g/kg 灌肠, 模型组及空白组给予相同体积的生理盐水灌肠。

**4.2 标本取材与制备** 给药 7 天后, 经麻醉后, 用镊子摘取小鼠一侧眼球, 取血, 离心, 取上层血清, 置于 -8 °C 冰箱保存。在无菌操作台上打开腹腔, 剖取肛门至盲肠末端的整个结肠组织, 于锡箔纸上铺开并观察小鼠结肠的外观形态; 随后截取结肠远端部分并沿肠系膜纵向剪开, 用 0.9% NaCl 溶液洗净结肠内容物后, 将结肠剪为 2 段, 一段置于 -8 °C 冰箱内冻存, 另一段放入 4% 的多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 溶液中固定备用。

**4.3 一般情况及疾病活动指数评估** 每天观察小鼠的活动性、进食情况、毛色的变化、体重变化, 记录小鼠的排便次数、粪便的性状、并进行潜血检测。根据小鼠体重、大便性状和便血情况评分相加为疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分<sup>[5]</sup>。小鼠体重下降评分: 体重下降百分率 (体重不变为 0, 1~5 为 1 分, 5~10 为 2 分, 10~15 为 3 分, >15 为 4 分)。大便性状评分: 正常计 0 分, 软便但成形计 1 分, 未成形便计 2 分, 稀便计 4 分。血便情况: 潜血阴性计 0 分, 潜血阳性计 1 分, 便中带血计 2 分, 血便计 4 分。

**4.4 ELISA 法检测小鼠血清 IL-10、IL-18 水平** 稀释抗原, 封板后于室温孵育 90 min。弃旧液, 加入 100  $\mu$ L 链霉亲和素及四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB), 室温避光孵育 30 min。加入 100  $\mu$ L 终止液、混匀, 用酶标仪于 450 nm、570 nm 处进行双波长检测, 算出校准 OD 值, 绘制标

准曲线并计算 IL-10、IL-18 含量。

**4.5 结肠病理组织学评价** 将固定 48 h 的各组小鼠结肠组织常规石蜡包埋, 切片厚度为 4  $\mu$ m, 行常规 HE 染色, 光镜下评估结肠组织学损伤情况, 具体评分标准如下: 溃疡 (0 分: 无溃疡; 1 分: 溃疡 <3 mm; 2 分: 溃疡 >3 mm), 炎症 (0 分: 无; 1 分: 轻度; 2 分: 重度), 肉芽肿 (0 分: 无; 1 分: 有), 病变深度 (0 分: 无; 1 分: 黏膜下层; 2 分: 肌层; 3 分: 浆膜层), 纤维化 (0 分: 无; 1 分: 轻度; 2 分: 重度)。

**4.6 Western Blot 法检测结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白表达水平** 将结肠组织剪碎后加 50  $\mu$ L 细胞裂解液离心取上清, BCA 法测定蛋白含量; 制胶并上样; 电泳 (浓缩胶电压为 80 V, 分离胶时调为 100 V, 继续电泳直至溴酚蓝泳出分离胶的下缘); 蛋白质的电转移 (恒流 30 mA, 90 min); 膜封闭 (PVDF 膜置于 5% TBS-T 脱脂奶粉溶液, 室温振荡 60 min); TBS-T 洗膜后加入漂洗液稀释的一抗 (TLR4 为 1:2 000, TRIF 为 1:1 000, IRF3 为 1:1 000, GAPDH 为 1:3 000), 4 °C 孵育过夜; 再次洗膜 3 次后加入稀释后的二抗 (TLR4 为 1:1 000, TRIF 为 1:2 000, IRF3 为 1:2 000, GAPDH 为 1:5 000), 37 °C 振荡 60 min, 洗膜 3 次, 振荡温育 5 min, 感光显影后扫描, 采用 IPP 软件对扫描图象的目的条带进行灰度分析。

**4.7 实时荧光定量 PCR 法检测 TLR4、TRIF、IRF3 mRNA 表达水平** 小鼠结肠组织研磨后加入 1 mL Trizol 裂解, 加入氯仿离心后, 再加入异丙醇萃取, 提取总 RNA。以 RNA 为模版反转录成 cDNA, 反转录体系总体积为 20  $\mu$ L [RNA 5  $\mu$ L, Oligo (dT) 2  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O (DEPC 处理) 4.5  $\mu$ L, 5  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu$ L, Ribonuclease inhibitor 0.5  $\mu$ L, M-MLV RT 1  $\mu$ L]。以 cDNA 为模版扩增目的基因, Real-Time PCR 体系总体积为 20  $\mu$ L [cDNA 2  $\mu$ L, 引物 1 (10 pmol/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 引物 2 (10 pmol/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, SYBR mix 10  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L]。反应条件: 预变性 (94 °C, 2 min, 循环 1 次); 扩增过程 (94 °C, 5 s; 60 °C, 30 s), 循环 45 次; 融解曲线分析: 72 °C, 10 min。引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 核苷酸序列及引物长度见表 1。采用相对定量 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法分析结果, 用各个样本的目的基因的 Ct 值 - 各个样本的看家基因 (GAPDH) 的 Ct 值, 得到 delta Ct; 用 delta Ct - 对照组的大概均值, 得到 delta delta Ct (2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>)。用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 计算各个样本目的基因的表达变化。

表 1 引物序列及长度

| 引物名称  | 上游序列                        | 下游序列                          | 引物长度 (bp) |
|-------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|
| TLR4  | 5'-GATCTGAGCTTCAACCCCTG-3'  | 5'-GTACCAAGGTTGAGAGCTGGT-3'   | 148       |
| IRF3  | 5'-CTTACGACAGGACGCACAGA-3'  | 5'-CGGTCCTCAGCTAATCGCAA-3'    | 165       |
| TRIF  | 5'-GGTGTCTCTTCTGTCAATCCA-3' | 5'-GGGATGCCCAAGAAGAACTTGTA-3' | 129       |
| GAPDH | 5'-GATCTGAGCTTCAACCCCTG-3'  | 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'    | 128       |

5 统计学方法 采用 SPSS 24.0 对数据进行统计分析,符合正态分布或近似正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数比较采用 SNK 检验,同组治疗前后对比使用配对 *t* 检验;重复测量资料采用重复测量的多因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠一般情况比较 空白组小鼠毛色正常,饮食及二便正常,饮用 3% DSS 混悬液后各组小鼠出现进食减少、活动量下降、体重减轻、毛色干枯、尿黄、大便次数增多,可见肉眼血便。中药组、西药组给药后,小鼠的血便、毛色、精神状态逐渐好转,体重较前增加。

2 各组小鼠干预期间不同时间点 DAI 比较 (表 2) 与空白组比较,给药后第 1 天至第 7 天,模型组 DAI 升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药组从第 2 天起至第 7 天,西药组从第 3 天起至第 7 天 DAI 降低 ( $P < 0.01$ );与西药组比较,中药组从第 4 天起至第 7 天,DAI 降低 ( $P < 0.01$ )。

3 各组小鼠病理学变化比较 (图 1) 空白组小

鼠结肠结构完整清晰,隐窝结构完整,杯状细胞未见破坏;模型组黏膜上皮脱落,腺体大小不等,排列紊乱,隐窝结构异常,周围炎症细胞浸润,部分腺体内出现异常增生细胞,伴有多处浅表及深溃疡形成。西药组可见炎性细胞浸润,伴有浅表溃疡形成。中药组黏膜较完整,腺体排列较整齐,伴有淋巴细胞浸润,无明显溃疡形成。

4 各组小鼠血清 IL-10 和 IL-18 水平比较 (表 3) 与空白组比较,模型组小鼠血清 IL-10 含量降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,西药组小鼠血清 IL-10 含量降低 ( $P < 0.01$ ),而中药组 IL-10 含量升高 ( $P < 0.01$ )。与西药组比较,中药组小鼠血清 IL-10 含量升高 ( $P < 0.01$ )。与空白组比较,模型组小鼠血清 IL-18 含量均升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,中药组小鼠血清 IL-18 含量降低 ( $P < 0.05$ )。与西药组比较,中药组 IL-18 含量降低 ( $P < 0.05$ )。

5 各组小鼠结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白表达 (图 2,表 4) 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织 TLR4、IRF3、TRIF 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,中药组小鼠结肠组织 TLR4、TRIF、

表 2 各组小鼠干预期间不同时间点 DAI 比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | n  | DAI 评分       |                          |                          |                           |                           |                           |                           |
|----|----|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|    |    | 1d           | 2d                       | 3d                       | 4d                        | 5d                        | 6d                        | 7d                        |
| 空白 | 20 | 0.03 ± 0.01  | 0.10 ± 0.19              | 0.08 ± 0.18              | 0.06 ± 0.17               | 0.08 ± 0.18               | 0.10 ± 0.21               | 0.06 ± 0.17               |
| 模型 | 20 | 2.07 ± 0.52* | 2.30 ± 0.45*             | 2.43 ± 0.40*             | 2.37 ± 0.40*              | 2.30 ± 0.46*              | 2.33 ± 0.41*              | 2.36 ± 0.40*              |
| 西药 | 20 | 2.27 ± 0.45  | 2.10 ± 0.54 <sup>△</sup> | 1.93 ± 0.57 <sup>△</sup> | 1.80 ± 0.53 <sup>△</sup>  | 1.67 ± 0.56 <sup>△</sup>  | 1.35 ± 0.53 <sup>△</sup>  | 1.23 ± 0.69 <sup>△</sup>  |
| 中药 | 20 | 2.33 ± 0.57  | 1.89 ± 0.39              | 1.74 ± 0.52 <sup>△</sup> | 1.33 ± 0.19 <sup>△▲</sup> | 0.94 ± 0.33 <sup>△▲</sup> | 0.74 ± 0.31 <sup>△▲</sup> | 0.39 ± 0.24 <sup>△▲</sup> |

注:与空白组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与西药组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.01$



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为西药组; D 为中药组; 箭头表示为炎性细胞浸润,腺体排列紊乱,隐窝结构异常

图 1 各组小鼠结肠组织比较 (HE 染色, × 100)

表 3 各组小鼠血清 IL-10、IL-18 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

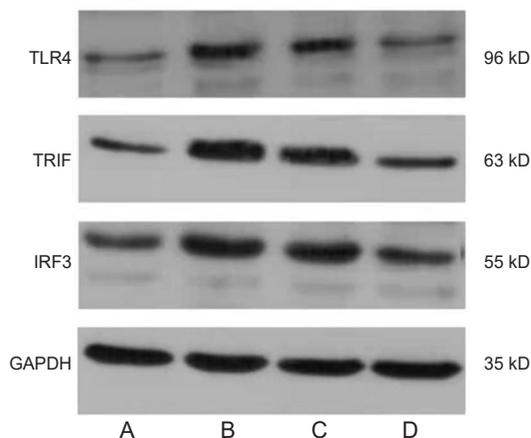
| 组别 | n  | IL-10 (pg/mL)                | IL-18 (ng/mL)             |
|----|----|------------------------------|---------------------------|
| 空白 | 20 | 36.67 ± 2.18                 | 0.39 ± 0.07               |
| 模型 | 20 | 19.41 ± 1.38**               | 0.94 ± 0.16*              |
| 西药 | 20 | 12.26 ± 1.17* <sup>△△</sup>  | 0.73 ± 0.12               |
| 中药 | 18 | 34.50 ± 2.13 <sup>△△△△</sup> | 0.58 ± 0.09 <sup>△△</sup> |

注:与空白组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01;与模型组比较,<sup>△</sup>P<0.05,<sup>△△</sup>P<0.01;与西药组比较,<sup>△</sup>P<0.05,<sup>△△</sup>P<0.01

表 4 各组小鼠结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | n | TLR4                        | TRIF                       | IRF3                        |
|----|---|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 空白 | 5 | 1.000 ± 0.000               | 1.000 ± 0.000              | 1.000 ± 0.000               |
| 模型 | 5 | 3.261 ± 0.028*              | 1.585 ± 0.013*             | 3.901 ± 0.040*              |
| 西药 | 5 | 1.784 ± 0.032 <sup>△</sup>  | 1.284 ± 0.005              | 3.589 ± 0.026               |
| 中药 | 5 | 1.385 ± 0.058 <sup>△△</sup> | 1.153 ± 0.019 <sup>△</sup> | 3.014 ± 0.035 <sup>△△</sup> |

注:与空白组比较,\*P<0.01;与模型组比较,<sup>△</sup>P<0.01;与西药组比较,<sup>△</sup>P<0.05



注:A为空白组;B为模型组;C为西药组;D为中药组

图 2 各组小鼠结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白表达电泳图  
IRF3 蛋白表达下降 ( $P<0.01$ ), 西药组 TLR4 蛋白表达下降 ( $P<0.01$ )。与西药组比较, 中药组 TLR4、IRF3 蛋白表达下降 ( $P<0.05$ )。

6 各组小鼠结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 mRNA 相对表达水平比较 (表 5) 与空白组比较, 模型组 TLR4、TRIF、IRF3 mRNA 表达升高 ( $P<0.01$ ), 与模型组比较, 西药组、中药组 TLR4、TRIF、IRF3 mRNA 表达降低 ( $P<0.01$ ); 与西药组比较,

表 5 各组小鼠结肠组织 TLR4、TRIF、IRF3 mRNA 相对表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | n | TLR4                       | TRIF                      | IRF3                       |
|----|---|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 空白 | 5 | 0.99 ± 0.019               | 0.96 ± 0.025              | 1.01 ± 0.014               |
| 模型 | 5 | 2.28 ± 0.016*              | 1.49 ± 0.035*             | 2.03 ± 0.031*              |
| 西药 | 5 | 1.29 ± 0.037 <sup>△</sup>  | 1.07 ± 0.030 <sup>△</sup> | 1.33 ± 0.035 <sup>△</sup>  |
| 中药 | 5 | 1.06 ± 0.043 <sup>△△</sup> | 1.11 ± 0.026 <sup>△</sup> | 1.23 ± 0.018 <sup>△△</sup> |

注:与空白组比较,\*P<0.01;与模型组比较,<sup>△</sup>P<0.01;与西药组比较,<sup>△</sup>P<0.05

中药组 TLR4、IRF3 表达降低 ( $P<0.05$ )。

## 讨论

UC 是一种发病机制尚未明确的胃肠道难治病。在全球范围内, UC 发病率呈逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。由于 UC 的发病机制尚未完全明确, 目前所有的药物均只能控制症状, 尚不能彻底治愈, 给患者及家庭带来了沉重的经济和心理负担。UC 发病病情缠绵, 正邪胶着, 不易速愈, 活动期 UC 结肠镜下表现为: 结肠黏膜连续性充血水肿, 多发性糜烂、溃疡, 上覆盖或夹杂血性脓性渗出物; 血管纹理模糊或消失, 呈砂纸颗粒状外观, 易出血。根据局部辨证可知肿而色红当属热, 热毒壅盛而致肉腐成脓, 故可见多发糜烂及溃疡; 黏膜黄白色分泌物或脓液属湿; 血管纹理模糊或消失, 乃血行不畅, 瘀血阻络之象, 因离经之血为瘀, 瘀血长期存留局部, 致新血不生, 同时阻滞气机, 使积滞不得下, 导致疾病反复发作, 迁延不愈, 乃久病入络之征, 故 UC 活动期存在“毒损肠络”的核心病机。基于此, 本研究团队设立了解毒活血灌肠方, 本方以黄连为主药, 黄柏、苦参为辅, 三者皆为苦寒之品, 功可清热燥湿, 泻火解毒, 厚胃肠, 主腹痛、肠癖、下痢, 性沉降而作用部位趋下。五倍子性寒, 味酸涩, 功可涩肠止泻、解毒消痈、敛疮止血, 故对久泻久痢、便血痔血效果甚佳。三七甘微苦温, 功可散瘀止血, 消肿定痛, 具有活血不伤血, 止血不留瘀之效。同时三七为五加科人参属植物, 兼具补益之功, 故可活血而不耗气。全方清热利湿解毒的同时, 又能活血通络, 故能针对 UC 湿热毒瘀之本。本方灌肠治疗 UC 活动期患者, 临床疗效确切, 且尚未监测到患者的不良反应及肝肾损害<sup>[4]</sup>。

目前认为, UC 患者存在肠道微生态失衡, 致病菌过度增殖, 内毒素增加, 导致肠道黏膜免疫失调, 从而诱发充血、水肿、糜烂、溃疡等炎性表现<sup>[6]</sup>。而 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是近年来发现的在抗感染及免疫反应中起重要作用的受体蛋白, 可广泛识别多种病原微生物的病原分子相关模式 (pathogen molecular associated pattern, PAMP)<sup>[7,8]</sup>。目前发现在 TLRs 家族中, TLR4 是与免疫性疾病及炎症性关系密切的一种常见的模式识别受体, 参与调节先天和后天免疫反应, 在识别微生物感染、内源性配体和宿主抵抗微生物感染、宿主性配体中起着重要作用<sup>[9,10]</sup>。已有实验证实, LPS 激活后的 TLR4 参与了 UC 的炎症反应<sup>[11]</sup>。现已知 TLR4 下游通路蛋白分别通过两个下游途径即髓分化因子

(myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖性和非 MyD88 依赖性途径启动下游信号转导。其中, MyD88 依赖性通路在炎症性肠病尤其是 UC 的调控作用为目前的研究热点<sup>[12,13]</sup>, 而非 MyD88 依赖性通路是否同样介导了 UC 的发生发展, 尚未得到证实。非 MyD88 通路又称 TRIF 通路, 在该通路中, TRIF 是转导途径中关键的转接分子, 是信号向下游转导的关键靶点; 其调控的下游信号分子——IRF3 是另一个重要的转录调节因子, 在 LPS 诱导的炎症反应失控和休克中起了重要作用<sup>[14-17]</sup>。TLR4 依靠 TRIF 作为重要的衔接分子, 下游调控 IRF3 影响适应性免疫应答, 从而介导机体的免疫应答及炎症反应。从肠道微生物生态来看, 肠道菌群失调引起肠道内致病菌过度繁殖, 损害肠黏膜屏障, 分泌肠毒素使肠上皮通透性增高, 肠腔内细菌及其产物进入肠黏膜固有层, 引发 TLR4 介导黏膜免疫失调, 从而诱发炎症性肠病, 这些毒素也与中医学“毒”的理念相符合, 毒素积聚, 损伤肠络, 肠黏膜屏障损伤, 炎症及异常的免疫功能亢进; 湿、热、瘀毒蕴积肠道, 相干为害, 气不布津, 血不养络, 肠络受损, 此乃 UC 发生、发展及反复发作的病机关键所在。

本研究中, DSS 造模 UC 小鼠均出现大便次数增多, 大便带脓血, 体重下降等表现。与模型组比较, 西药组及中药组均出现小鼠精神状态改善, 体重增加, DAI 评分改善, 结肠组织炎症减轻, 而中药组总体疗效优于西药组。与西药组比较, 中药组能够显著上调抗炎因子 IL-10 的水平。造模各组动物结肠组织中 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白及 mRNA 表达上调, 中药干预后小鼠结肠 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白及 mRNA 降低。综上, 解毒活血方灌肠治疗能通过下调 TLR4、TRIF、IRF3 蛋白的表达, 减轻 UC 小鼠结肠炎症, 促进结肠黏膜修复。同时解毒活血灌肠方具有促进抗炎因子释放, 降低促炎因子水平的双向调控作用。以清热、利湿、活血、解毒为主的解毒活血灌肠方治疗 UC 的机制可能与调控 TLR4/TRIF/IRF3 通路, 调整机体适应性免疫应答, 恢复肠黏膜屏障功能, 从而恢复机体正常的免疫应答和炎性反应最终达到治疗 UC 的目的。本次研究同时还发现, 经中药、西药灌肠治疗后, 小鼠 DAI 较模型组明显降低, 且中药组优于西药组, 说明不同的治疗方法是促进 UC 小鼠肠道修复的主效应。同时, 给药时间也会影响 DAI 评分, 表现为伴随给药时间延长, 中药组、西药组小鼠 DAI 逐渐降低, 因此, 给药时间对 UC 小鼠肠道修复亦具有交互作用, 说明 UC 治疗对于时间亦具有依赖性, 用药

时间是影响 UC 疗效的重要因素, 提示在临床治疗中, 足疗程用药对于 UC 长期诱导缓解具有重要作用。

**利益冲突:** 本研究不存在利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population based studies[J]. *Lancet*, 2017, 390 (10114): 2769-2778.
- [2] Rubin DT, Ananthakeishnan AN, Siegel CA, et al. ACG clinical guideline: ulcerative colitis in adults[J]. *Am J Gastroenterol*, 2019, 114 (3): 384-413.
- [3] Magro F, Lopes J, Borralho P, et al. Comparison of different histological indices in the assessment of UC activity and their accuracy regarding endoscopic outcomes and faecal calprotectin levels[J]. *Gut*, 2018, 3: 315-345.
- [4] 林燕, 王新月, 韩昌盛. 中医综合治疗溃疡性结肠炎的疗效评价[J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 5 (11): 956-958.
- [5] Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12 (7): 1295-1309.
- [6] Geremia A, Biancheri P, Allan P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13 (1): 3-10.
- [7] Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, present, and future[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 391-412.
- [8] Ghavami SB, Yadegar A, Aghdaei HA, et al. Immunomodulation and generation of tolerogenic dendritic cells by probiotic bacteria in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (17): 10.3390/ijms21176266.
- [9] Mahmoud TN, El-Maadawy WH, Kandil ZA, et al. *Bailey rhizome* Extract ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via modulating intestinal mucosal dysfunction, oxidative stress, inflammation, and TLR4/ NF-kappa B and NLRP3 inflammasome pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 269 (4): 113670.

- [ 10 ] Saber S, Youssef ME, Sharaf H, et al. BBG enhances OLT1177-induced NLRP3 inflammasome inactivation by targeting P2X7R/NLRP3 and MyD88/NF-kappa B signaling in DSS-induced colitis in rats[J]. *Life Sci*, 2021, 270 ( 4 ): 119123.
- [ 11 ] Zhang ZC, Li S, Cao HY, et al. The protective role of phloretin against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. *Food Funct*, 2019, 10 ( 1 ): 422–431.
- [ 12 ] Zhang YF, Han DD, Yu S, et al. Protective effect of iridoid glycosides of the leaves of *Syringa oblata* Lindl. on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by inhibition of the TLR2/4/MyD88/NF-kappa B signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2020: 7650123.
- [ 13 ] Pascual-Itoiz MA, Pena-Cearra A, Martin-Ruiz I, et al. The mitochondrial negative regulator MCJ modulates the interplay between microbiota and the host during ulcerative colitis[J]. *Sci Reports*, 2020, 10 ( 1 ): 572.
- [ 14 ] Lin CH, Chang YC, Chang TK, et al. Enhanced expression of coxsackie virus and adenovirus receptor in lipopolysaccharide-induced inflammatory macrophages is through TRIF-dependent innate immunity pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 215 ( 1 ): 118832.
- [ 15 ] Bonhomme D, Santeccchia I, Vernel-Pauillac F, et al. Leptospiral LPS escapes mouse TLR4 internalization and TRIF-associated antimicrobial responses through O antigen and associated lipoproteins[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16 ( 12 ): e1009173.
- [ 16 ] Antonia RJ, Hagan RS, Baldwin AS, et al. Expanding the view of IKK: new substrates and new biology[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 31 ( 3 ): 166–178.
- [ 17 ] Ascher S, Wilms E, Pontarollo G, et al. Gut microbiota restricts netosis in acute mesenteric ischemia-reperfusion injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40 ( 9 ): 2279–2292.

( 收稿: 2021-04-05 在线: 2021-08-02 )

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶

## 中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号, 可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》及 *Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息, 同时可查看两本期刊的全文信息, 欢迎广大读者订阅。

