

· 基础研究 ·

清肠化湿方对溃疡性结肠炎 NF- κ B/Tolls 通路的影响及其机制

沈 洪¹ 刘智群² 朱 荃³ 朱 磊¹ 翟金海⁴

摘要 目的 观察清肠化湿方对人结肠癌上皮细胞株 (HT-29 细胞) 核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)、Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 蛋白的活化、表达以及白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 含量的影响, 探讨其治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的可能机制。方法 予肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导 HT-29 细胞炎症模型, 实验分为空白对照组, 模型对照组, 柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine, SASP) 组, 清肠化湿方低、中、高剂量组。采用 MTT 法检测实验药物对细胞生长的影响, 用 Transwell 观察巨噬细胞趋化情况, 免疫细胞荧光法检测 NF- κ B、TLR4 蛋白, ELISA 法检测 IL-8 含量。结果 各实验药物未见抑制细胞生长。清肠化湿方各剂量组在抑制巨噬细胞趋化、减少 NF- κ B 活化, 降低 TLR4 表达, 减轻 IL-8 分泌方面, 与模型对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 清肠化湿方高剂量组对巨噬细胞趋化的抑制作用与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而抑制 NF- κ B 活化入核的作用高于 SASP 组 ($P < 0.05$)。结论 清肠化湿方可明显减轻 HT-29 细胞炎症反应, 抑制巨噬细胞趋化, 减少 NF- κ B 活化入核、降低 TLR4 的表达, 减轻 IL-8 的分泌, 这可能是其治疗 UC 的作用机制之一。

关键词 清肠化湿方; 溃疡性结肠炎; 核因子- κ B; Toll 样受体-4; 白介素-8

Effect of Qingchang Huashi Recipe on NF- κ B/Tolls Pathway in Ulcerative Colitis Patients and Mechanism Study SHEN Hong¹, LIU Zhi-qun², ZHU Quan³, ZHU Lei¹, and ZHAI Jin-hai⁴ 1 Department of Gastroenterology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029), China; 2 Department of Gastroenterology, Nanjing Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210001), China; 3 Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau, China; 4 First Clinical Medical School, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210046), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of Qingchang Huashi Recipe (QHR) on the activation and expressions of nuclear factor κ B (NF- κ B), Toll-like receptors (TLRs), and contents of interleukin-8 (IL-8), thus exploring its possible mechanisms for treating ulcerative colitis (UC). Methods The HT-29 cells were induced to inflammation model by tumor necrosis factor- α (TNF- α) and lipopolysaccharides (LPS). HT-29 cells were divided into 6 groups, i.e., the vehicle control group, the model control group, the sulfasalazine (SASP) group, the high dose QHR group, the middle dose QHR group, the low dose QHR group. Effects on the cell growth were detected by MTT. The chemoattractant of macrophages was observed using Transwell. The expressions of NF- κ B and TLR4 protein were detected using immune cell fluorescence method. The content of IL-8 was detected by ELISA. Results The growth of cells were not inhibited in each group. Statistical difference existed in each dose QHR group in inhibiting the chemoattractant of

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81072778); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK2011078); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (No. B222); 江苏省中医药局课题资助项目 (No. JD11002, JD11011)

作者单位: 1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院消化科 (南京 210029); 2. 南京市中医院消化科 (南京 210001); 3. 澳门科技大学中医药学院 (澳门); 4. 南京中医药大学第一临床医学院 (南京 210046)

通讯作者: 沈 洪, Tel: 13851872859; E-mail: shenhong999@163.com

注: 本文章所有实验在澳门科技大学中医药实验研究基地完成

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 09. 1216

macrophages, reducing activation of NF- κ B, lowering expressions of TLR4 protein, and decreasing the secretion of IL-8, when compared with the model control group ($P < 0.05$). No statistical difference existed in inhibiting the chemoattractant of macrophages between the high dose QHR group and the vehicle control group ($P > 0.05$). But its inhibition on NF- κ B activation was higher in the high dose QHR group than in the SASP group ($P < 0.05$). Conclusion QHR could obviously attenuate the inflammatory reaction of HT-29 cells, inhibit the chemoattractant of macrophages, reduce the activation of NF- κ B, lower expressions of TLR-4, and attenuate the secretion of IL-8, which might be one of its mechanisms for treating UC.

KEYWORDS Qingchang Huashi Recipe; ulcerative colitis; NF- κ B; Toll-like receptor 4; interleukin 8

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的肠道慢性非特异性炎症性疾病,属于中医学的“泄泻”、“痢疾”、“肠癖”等范畴。近年来,随着对核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)在肠道炎症中的枢纽作用的阐明,抑制 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)/NF- κ B 通路的关键分子,阻断 UC 的炎症反应,已成为研究热点之一。中医学认为,UC 活动期以湿热蕴结为主要病机,笔者以清热化湿、敛疮生肌为治疗原则,对刘完素治痢名方芍药汤进行化裁,拟创清肠化湿方,用于轻、中度 UC 的治疗,取得了良好的效果^[1-4]。

本实验通过肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)刺激 HT-29 人类结肠癌细胞株制备炎症模型,观察清肠化湿方对 HT-29 细胞炎症状态下巨噬细胞迁移情况的影响, NF- κ B、TLR4 蛋白的活化、表达, IL-8 的分泌情况,并探讨其作用机制。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌上皮细胞株(HT-29):购自中国科学院细胞库。

1.2 实验药物 清肠化湿方(由黄连、黄芩、煨木香、炒白芍、生地榆、白芷、徐长卿、生甘草组成)购自江苏省医药公司,生产批号分别为:20101201、20101201、20100501、20101001、20090901、20101201、20101201、20101201;以上药物均在南京市药品检验所进行质量检验,鉴定为合格中药饮片。柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine, SASP):美国 Sigma 公司。

1.3 实验试剂 McCoy's5a 培养基及(LPS)均购自 Sigma 公司;胎牛血清,杭州四季青公司;hTNF- α , Pepro Tech 公司;兔抗 NF- κ B 单克隆抗体, CST 公司;兔抗 TLR4 多克隆抗体, Santa cruz 公司;Rhodamine (TRITC)标记的二抗, Protein tech 公司;Transwell 小室, Corning 公司;人 IL-8 的 ELISA 检测试剂盒, 武汉博士德公司,批号:EK0413。

1.4 主要仪器 ZFMQ050PE 型超纯水器, Mil-

lipore 公司;低温超速离心机, Eppendorf 公司; Spectra Max190 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司;旋转蒸发仪, EYELA 公司;CCA-20 低温冷却水循环泵, 巩义市予华仪器有限公司;DZF-6210 真空干燥箱, 上海齐欣科学仪器有限公司;倒置显微镜及荧光显微镜, Olympus;电热恒温鼓风干燥箱, 上海博泰实验仪器有限公司。

2 方法

2.1 中药浸膏制备 按成人用量,称取上述清肠化湿方 1 剂,共 87 g,投入提取罐中,浸泡,煎煮 2 次,合并 2 次药液,予旋转蒸发仪中蒸发,减压浓缩,真空干燥箱中干燥成药物细粉。称取清肠化湿方清膏 26.43 g,即浸膏量 30.4%。

2.2 实验分组 实验分为 6 组:空白对照组加入含 2% FBS 的 McCoy5a 培养基孵育,实验过程中不予任何药物干预,模型对照组予 hTNF- α (20 ng/mL)孵育 12 h 后,再予 LPS (1 μ g/mL)^[5]孵育 15 h;实验组在上述药物干预的基础上,加入 SASP (2 mmol/L)^[6]、根据前期预实验结果,加入清肠化湿方低剂量(100 ng/mL)、清肠化湿方中剂量(1 μ g/mL)、清肠化湿方高剂量(10 μ g/mL)孵育 24 h。采用 MTT 法检测实验药物对细胞生长影响时,加做二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)组作为阳性对照。

2.3 MTT 法检测不同浓度药物对 HT-29 细胞生长的影响 取对数生长期 HT-29 细胞,按 1×10^4 /孔的浓度同时接种于 2 块 96 孔培养板中,每孔 200 μ L,待细胞生长至 80% 融合时,更换为分别含有上述浓度药物的培养基继续培养,培养结束前 4 h,加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L,4 h 后吸弃培养基,每孔加入 100% DMSO 溶液 150 μ L 溶解甲瓟颗粒,酶标仪测定 490 nm 吸光度(A 值)。分别在 24 h 和 48 h 各测定 1 次生长情况,两个时间点分别设立阴性对照组和 1% DMSO 阳性对照组,各组均设 3 个复孔。

2.4 巨噬细胞趋化实验 取健康成年小鼠,腹腔注射 10 mL 预冷无菌 PBS,脱颈椎处死,沿腹中线

剪开,滴管吸取注入的 PBS, NH_4Cl 祛除红细胞, 2 000 r/min 离心。McCoy's 5a + 10% FBS 培养基将分离提取的小鼠腹腔巨噬细胞重悬,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,每孔 400 μL 加入 transwell 上室,下室为每孔 1 mL 预处理的 HT-29 细胞。将 transwell 置入培养箱中,共培养 12 h。将 transwell 小室取出后用 PBS 清洗,湿棉签擦净小室上表面细胞,自然风干,于 0.1% 结晶紫中浸泡 30 min, PBS 漂净, 10% 醋酸溶液洗脱结晶紫,于 580 nm 测定光吸收值 (OD)。以空白对照组细胞 OD 为参照,分别按公式计算各组细胞趋化指数。趋化指数 = (实验组细胞 OD 值/对照组细胞 OD 值) $\times 100\%$ 。

2.5 免疫细胞荧光检测 HT-29 细胞 NF- κB 及 TLR4 蛋白 调整 HT-29 细胞密度为 2×10^5 , 种植于预先放置有灭菌盖玻片的 24 孔板中, 37°C 培养细胞至 70% ~ 80% 融合,加入 20 ng/mL TNF- α 孵育 12 h, NF- κB 组在所有药物干预结束前加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 继续诱导 15 min; TLR4 组细胞实验方法如前述,在 TNF- α 干预结束后,加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 诱导 15 h,再予实验药物干预。实验结束后,弃上清培养基,预冷的 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次 $\times 5$ min, 0.2% TritonX-100 破膜 15 min, PBS 洗 3 次 $\times 5$ min, 5% BSA 封闭 1 h, 加入按 1:50 稀释的一抗 37°C 湿盒内孵育 2 h, PBS 洗 3 次 $\times 5$ min, 加入 1:50 稀释的 TRITC 标记的二抗室温避光孵育 30 min, PBS 洗 3 次 $\times 10$ min, 抗荧光淬灭封片液封片, 荧光显微镜观察并拍照。红色荧光为阳性染色,用 ImagePro Plus 软件进行图像分析。计数入核细胞数目,观察 NF- κB 活化情况,计算阳性细胞百分率^[7];用平均荧光强度统计 TLR4 蛋白表达情况。

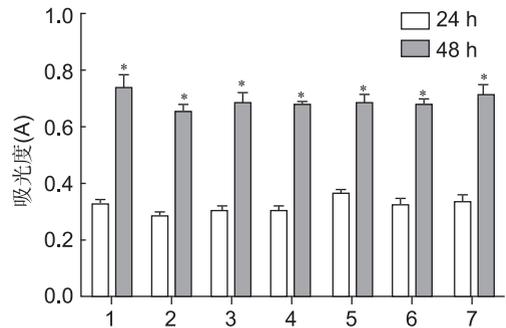
2.6 ELISA 法检测 HT-29 细胞上清液 IL-8 含量 收集细胞上清液,至 1.5 mL Eppendorf 管, 1 600 r/min 离心 5 min, 取上清。按试剂盒说明书,按 100 μL 孔将样本加入相应的孔中, 37°C 孵育 90 min, 洗板 3 次;除空白孔外,加入生物素化抗体工作液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 60 min, 洗板 3 次;除空白孔外,加入酶结合物工作液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 60 min, 洗板 5 次;加显色剂 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 15 min;终止液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 混匀后 5 min 内在酶标仪上检测各孔吸光度 (A), 测量波长为 450 nm。

3 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件。各实验独立重复 ≥ 3 次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用配对 t 检验, 多组间比较采用 Oneway-ANOVA。统计作图采用 GraphPad Prism5。 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

结 果

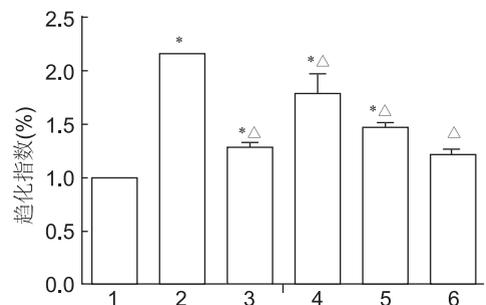
1 各组 HT-29 细胞生长情况比较(图 1) 从加药后的 24 h 后开始观察,结果显示不同浓度药物与细胞共培养 48 h, 细胞增殖良好,与本组 24 h 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组与空白对照组比较,生长趋势一致,各组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:1 为空白对照组;2 为 DMSO 组;3 为模型对照组;4 为 SASP 组;5 为清肠化湿方低剂量组;6 为清肠化湿方中剂量组;7 为清肠化湿方高剂量组;与本组 24 h 细胞数量比较, * $P < 0.05$

图 1 各组 HT-29 细胞生长情况比较

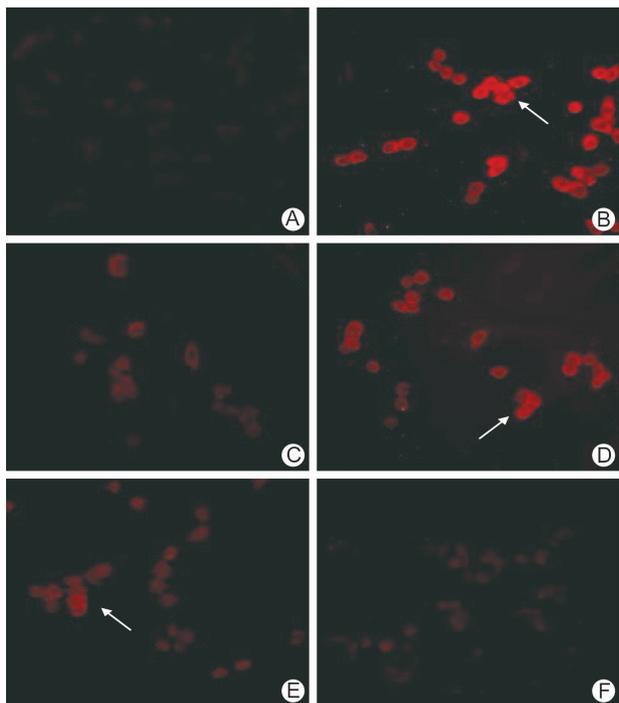
2 各组小鼠腹腔巨噬细胞趋化比较(图 2) 与空白对照组比较,模型对照组巨噬细胞迁移数目明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型对照组比较,各药物治疗后迁移减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。清肠化湿方高剂量组较空白对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:1 为空白对照组;2 为模型对照组;3 为 SASP 组;4 为清肠化湿方低剂量组;5 为清肠化湿方中剂量组;6 为清肠化湿方高剂量组;图 4、图 6、图 7 同;与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

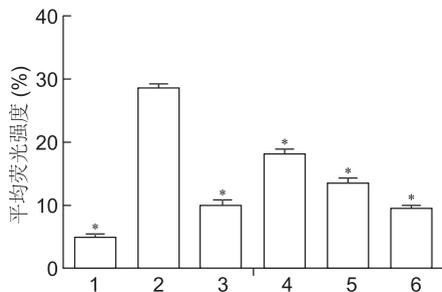
图 2 各组小鼠腹腔巨噬细胞趋化比较

3 各组 HT-29 细胞 TLR4 蛋白表达比较(图 3,4) 空白对照组 TLR4 在细胞膜或细胞浆微弱表达,模型对照组 TLR4 表达增加,细胞膜或细胞浆见强红色荧光,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型对照组比较,各药物组 TLR4 表达降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注:箭头所示为:阳性表达的 HT-29 细胞(细胞膜或细胞浆见红色荧光);A 为空白对照组;B 为模型对照组;C 为 SASP 组;D 为清肠化湿方低剂量组;E 为清肠化湿方中剂量组;F 为清肠化湿方高剂量组;图 5 同

图 3 各组 HT-29 细胞 TLR4 蛋白表达比较 (Rhodamine 法, ×400)



注:与模型对照组比较, *P < 0.05

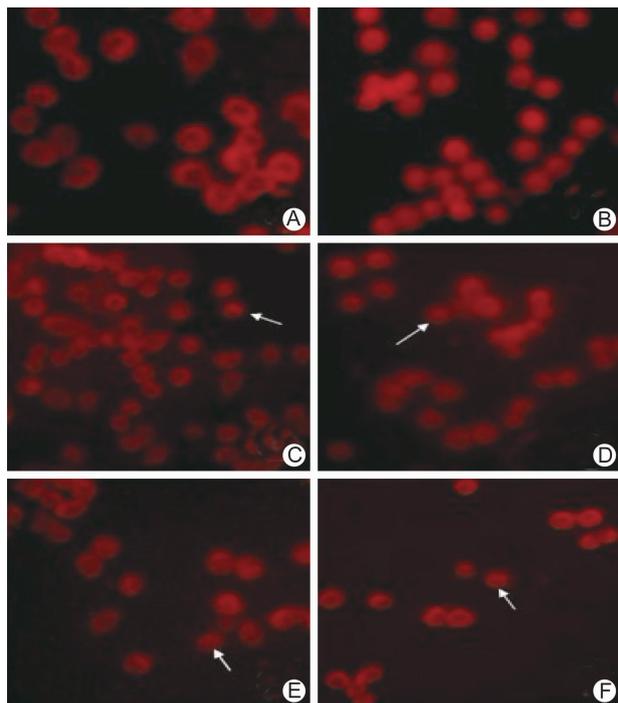
图 4 各组 HT-29 细胞 TLR4 蛋白表达比较

4 各组 HT-29 细胞 NF-κB 蛋白活化比较(图 5.6) 空白对照组 NF-κB 在细胞浆表达,模型对照组 NF-κB 活化入核,细胞核见红色荧光,与模型对照组比较,各药物组 NF-κB 入核数量减少,差异有统计学意义(P < 0.05)。清肠化湿方高剂量组与 SASP 组比较,差异有统计学意义(P < 0.05)。

5 各组 HT-29 细胞 IL-8 分泌比较(图 7) 与正常对照组比较,模型对照组 IL-8 分泌明显增多(P < 0.05);与模型对照组比较,各药物组 IL-8 分泌量降低,差异有统计学意义(P < 0.05)。

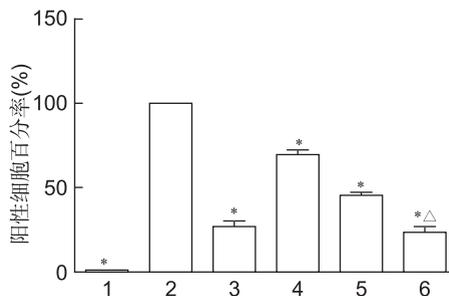
讨 论

UC 近年来在我国的病例报道有逐年增加趋势,已



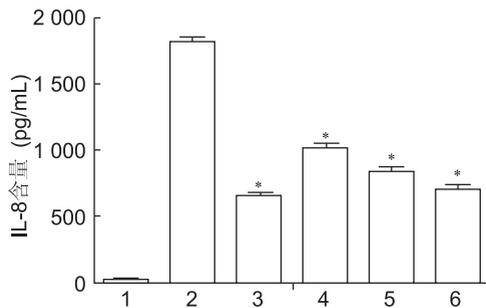
注:箭头所示为阳性表达的 HT-29 细胞(NF-κB 入核后细胞核见红色荧光)

图 5 各组 HT-29 细胞 NF-κB 蛋白活化的比较 (Rhodamine 法, ×400)



注:与模型对照组比较, *P < 0.05;与 SASP 组比较, ΔP < 0.05

图 6 各组 HT-29 细胞 NF-κB 蛋白活化比较



注:与模型对照组比较, *P < 0.05

图 7 各组 HT-29 细胞 IL-8 分泌比较

成为临床常见的难治性疾病。迄今为止,UC 的特异性致病因素和发病机制仍未明确,目前多认为是多因素、多机制作用的结果。清肠化湿方中,黄芩、黄连清

热燥湿;煨木香、炒白芍、生地榆理气和血;白芷消痈敛疮、徐长卿理气止痛;生甘草和中调药。处方简单,共奏清热化湿,调气和血,敛疮生肌之效。

肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IEC)是宿主黏膜屏障重要的组成部分。肠上皮一方面必须对存在的天然菌群保持“沉默”,另一方面又时刻准备抵御入侵的病原体。在研究炎症性肠病发病机制中,建立炎症细胞模型是必不可少。由于原代分离培养肠上皮细胞比较困难,目前,主要使用结肠癌细胞株进行研究,HT-29 人结肠癌细胞株表面低表达 TLR4 蛋白,对 LPS 低反应性,经 TNF- α 刺激后可上调 TLR4 的表达,增强对 LPS 的反应性^[8]。

白细胞浸润是炎症反应的关键环节之一,在 TNF- α 、LPS 所致炎症发生过程中,白细胞通过血管壁渗出到血管外,并在局部组织中大量聚集,而单核/巨噬细胞通常是到达浸润部位的主要炎症细胞之一。细胞迁移发生于多种生理及病理过程中,包括胚胎形成、机体免疫、急慢性炎症及慢性肿瘤等^[9],当机体感染 G⁻ 菌时,脂多糖释放入血,与血浆中的脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)结合形成复合物,再由 LBP 运送至单核/巨噬细胞,使细胞内多条信号通路活化从而促进大量细胞因子和黏附分子等基因的表达,引起瀑布式的炎症级联反应^[10]。本实验用 TNF- α 、LPS 共刺激 HT-29 细胞,制备炎症模型,并进行相应的药物干预。通过对小鼠腹腔注射 PBS 冷刺激,成功诱导巨噬细胞浸润,并将分离提取的巨噬细胞与 HT-29 细胞共培养,模型对照组巨噬细胞迁移明显增多,提示造模成功。同时,运用 MTT 法检测实验用药的细胞毒作用,均未见抑制细胞生长。

TLRs 是一类广泛分布在免疫细胞尤其固有免疫细胞以及某些体细胞表面的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR),LPS 是 TLR4 的主要配体。NF- κ B 与一类被称为 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)的物质结合在一起,以无活性的状态存在于细胞浆中,当受到 TNF- α 、LPS 等细胞外信号刺激时,被表面的 TLR4 识别,向细胞内传递活化信号,I κ B 发生磷酸化进而泛素化和降解,于是受其抑制的 NF- κ B 得已被激活,脱离抑制蛋白的 NF- κ B 迅速从细胞质易位到细胞核。业已证实,IL-8 基因启动子上含有 NF- κ B 结合位点,与 NF- κ B 位点结合后,导致相应的基因表达 mRNA,促进其细胞因子的释放;释放的细胞因子又可反过来进一步活化 NF- κ B,由此形成一个正反馈调节,使炎症不断放大。鉴于肠上皮在应对常驻菌和 LPS 时应保持免疫沉默,故理论上 IEC 表达低水平的 TLR4 十分合理,其目的在于保护宿主在高浓度的

LPS 环境中不致发生肠道慢性炎症的激活,本实验研究发现,预先用 TNF- α 刺激,可增强其对 LPS 的反应性,造成 IEC 对常驻菌的过度反应,从而启动或加重肠道炎症。

本实验通过用 TNF- α 、LPS 共刺激,制备 HT-29 细胞炎症模型,观察清肠化湿方抑制炎症的作用。实验表明,炎症状态下,巨噬细胞趋化明显增多,清肠化湿方治疗后,NF- κ B 入核数量减少,TLR4 蛋白表达降低,IL-8 分泌量降低,高剂量的清肠化湿方(10 μ g/mL)对巨噬细胞趋化的抑制作用与空白对照组比较无明显差异,同时,抑制 NF- κ B 活化入核的作用高于 SASP 组(2 mmol/L)。中药清肠化湿方可能通过抑制 TLR4 的表达,减少 NF- κ B 活化,减轻 IL-8 分泌,进而减轻炎症反应,这可能是清肠化湿方治疗 UC 的作用机制之一。

参 考 文 献

- [1] 沈洪,张声生,王垂杰,等. 中药分期序贯方案对轻中度溃疡性结肠炎血沉和 C 反应蛋白的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2011, 31(2): 101-103.
- [2] 沈洪,张声生,王垂杰,等. 中药序贯治疗轻中度溃疡性结肠炎的短期疗效观察[J]. 辽宁中医杂志,2011, 38(2): 196-198.
- [3] 沈洪,张声生,王垂杰,等. 中药分期序贯治疗轻中度溃疡性结肠炎 111 例疗效观察[J]. 中医杂志,2011, 52(13): 1108-1111.
- [4] 沈洪,张声生,王垂杰,等. 中药分期序贯治疗轻中度溃疡性结肠炎临床观察[J]. 中华中医药杂志,2012, 27(7): 1788-1791.
- [5] Haller D, Holt L, Parlesak A, et al. Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced nuclear factor- κ B activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells[J]. Immunology, 2004, 112(2): 310-320.
- [6] Matteo Forloni, Sonia Albin, Maria Zaria Limongi, et al. NF- κ B, and not MYCN, regulates MHC Class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 916-924.
- [7] Gil Melmed, Lisa S. Thomas, Nahee Lee, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut[J]. J Immunol, 2003, 170(3): 1406-1415.
- [8] Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells[J]. Biol Chem, 2002, 277(23): 20431-20437.
- [9] Jin T, Xu X, Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease [J]. Cytokine, 2008, 44(1): 1-8.
- [10] Herzum I, Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(6): 581-587.

(收稿:2012-10-28 修回:2013-07-01)