

复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 ROR γ t、Foxp3 表达的影响

李克亚¹, 王真权^{1*}, 张佳敏²

(1. 湖南中医药大学第二附属医院肛肠三科, 湖南长沙 410005; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: **目的** 研究复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 ROR γ t、Foxp3 表达的影响。**方法** 复合法(三硝基苯磺酸+乙醇)制备溃疡性结肠炎大鼠模型, 大鼠随机分为正常对照组、模型组、美沙拉嗪组(5%)及复方芩柏颗粒剂高、中、低剂量组(6%、12%、24%), 灌肠给药3周。然后, 评估大鼠饮水量、体质量、结肠组织损伤程度, ELISA 法测定血清中 TGF- β 1、IL-17 水平, HE 染色观察病理变化, Western blot、RT-PCR 法检测结肠组织中 ROR γ t、Foxp3 蛋白和 mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 复方芩柏颗粒剂组大鼠饮水量、体质量、TGF- β 1 及 IL-17 水平、结肠组织损伤程度显著改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时可调节 ROR γ t/Foxp3 失衡, 并呈一定量效关系。**结论** 复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用可能是通过调控 ROR γ t/Foxp3 失衡, 从而下调 IL-17 表达来实现。

关键词: 复方芩柏颗粒剂; 溃疡性结肠炎; 结肠组织; ROR γ t; Foxp3

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2019)06-1411-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.06.044

溃疡性结肠炎是一种原因不明的慢性直肠和结肠炎性疾病, 其发病率逐年提高, 但现代医学对其病因、病理机制尚不明确, 导致临床治疗缺乏特异性^[1-3]。中医药治疗溃疡性结肠炎的临床报道很多, 均有一定疗效, 但对其作用机理的探讨还不够深入, 难以系统的现代科学和微观角度解释阐述, 从而使其可信度不足, 难以向社会推广^[4-6]。

大多数溃疡性结肠炎发病与中医“湿热”“气滞”“血瘀”等病机有关^[7], 在此思路的启发下, 课题组前期对古方止痛如神汤进行化裁, 用具有清热利湿、行气止痛、化瘀止血功效的复方芩柏颗粒剂保留灌肠治疗; 本实验基于前期动物实验及十多年临床研究, 研究该制剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 ROR γ t、Foxp3 表达的影响, 为进一步探讨其作用机制提供依据^[8]。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 60 只, 体质量 (220 \pm 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0011, 动物质量合格证 11400700254258, 适应性喂养 2~3 d。

1.2 模型建立^[9] 大鼠造模前禁食不禁水 24 h, 5% TNBS 与无水乙醇按 1:1 体积配制成混合液。实验时腹腔注射 10% 水合氯醛 (3.5 mL/kg) 麻醉大鼠, 将一直径 2.0 mm、长约 12 cm 的硅胶管用石蜡油润滑, 由肛门处轻缓插入大鼠体内约 8 cm, 按 100 mg/kg 剂量对正常对照组、造模组大鼠分别缓慢注入生理盐水、混合液, 提起尾部持续倒置

10 min 以使造模剂充分渗入肠腔内, 仰卧归笼, 保温灯照射至大鼠自然苏醒, 自由饮食。实验前随机抽取 10 只造模大鼠, 颈椎脱臼法处死后取其结肠组织, 病理检查确认有充血、水肿、溃疡形成等溃疡性结肠炎典型病理变化时可认为造模成功。

1.3 试剂及仪器 复方芩柏颗粒剂 (湖南中医药大学第二附属医院肛肠科自制)。HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)。ELISA 试剂盒、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (A3500)、qPCR mix (A6001) (美国 Promega 公司); ROR γ t、Foxp3、 β -actin 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; RIPA 蛋白裂解液 (CW2334S)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (CW0014S)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (CW0022) (北京康为世纪生物科技有限公司); 彩色预染蛋白 Marker (加拿大 Fermentas 公司); ECL 发光检测试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司, 35055); ROR γ t 抗体 (bs-10647R)、Foxp3 抗体 (bs-0269R) (北京博奥森生物技术有限公司); β -actin 抗体 (英国 Abcam 公司, ab8227); HRP 标记的羊抗鼠二抗 (SA00001-1)、HRP 标记的羊抗兔二抗 (SA00001-2) (武汉三鹰生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 正常对照组、模型组、美沙拉嗪组于造模 2 周后开始分别以蒸馏水、5% 美沙拉嗪混悬液各 2 mL

收稿日期: 2018-10-09

基金项目: 湖南省中医药管理局一般项目 (201786)

作者简介: 李克亚, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为中西医结合肛肠疾病防治

* 通信作者: 王真权, 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师。E-mail: wangzhenquan123456@163.com

灌肠, 复方芩柏颗粒剂低、中、高剂量组分别以 6%、12%、24% 药物混悬液各 2 mL 灌肠。各组每天给药 2 次, 连续 3 周。

2.2 指标检测

2.2.1 一般情况 每天称取大鼠体质量, 观察大便性状, 检测便潜血, 评估疾病活动指数 (DAI), 公式为 DAI=体质量下降指数+大便性状+大便潜血。评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准

| 体质量下降率/% | 大便性状 | 大便出现情况 | 分数 |
|----------|------|--------|----|
| <1 | 正常 | 正常 | 0 |
| 1~4.99 | 略松散 | 隐血阳性 | 1 |
| 5~10 | 松散 | 肉眼出血 | 2 |
| >10 | 腹泻 | 血便 | 3 |

2.2.2 血清 TGF-β1、IL-17 水平检测 实验结束时麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 2 500 r/min 离心 10 min, 收集血清液, 置 -20 °C 冰箱中保存备用, ELISA 法检测 TGF-β1、IL-17 水平。

2.2.3 结肠组织病理观察 选取大鼠结肠病变区组织, 10% 中性甲醛固定, 梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 间断连续切 5 μm 厚片, HE 染色, 脱水, 透明, 封片, 光学显微镜下观察结肠组织病理改变。

2.2.4 结肠组织中 RORγt、Foxp3 蛋白表达检测 采用 Westren-blot 法。取大鼠结肠组织, 于液氮中研磨至粉末状, 提取组织总蛋白, BCA 法测定蛋白量, 取 50 μg 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后封闭处理 1 h, 加入一抗 RORγt、Foxp3、β-actin (1:1000) 孵育过夜, 二抗 (1:3000) 室温孵育 1 h, 暗室加 ECL 化学发光剂于化学发光仪成像, IPP6.0 图像分析软件对图像进行信号分析, 计算目的蛋白/β-actin 蛋白比值。

2.2.5 结肠组织中 RORγt、Foxp3 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 法。Trizol 法提取细胞总 RNA, 超微量紫外分光光度计检测浓度后将 1 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA, 以其为模板采用荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增, 操作均按照相应试剂盒说明书进行。qPCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 循环 40 次, 以 β-actin 为内标, 2^{-ΔΔCt} 法计算 RORγt、Foxp3 相对表达, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列见表 2。

表 2 PCR 引物序列

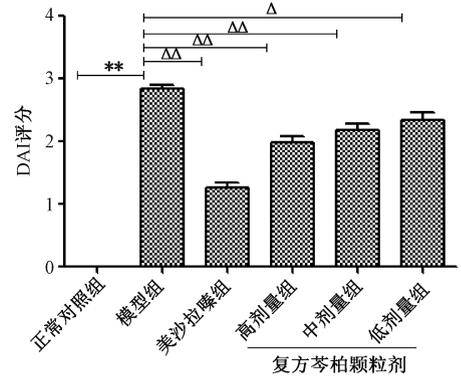
| 引物 | 正向(5'-3') | 反向(5'-3') |
|---------|---------------------|---------------------|
| β-actin | ACGTTGCTATCCAGGCTGT | CTCGGTGAGGATCTTCATG |
| Foxp3 | GCCAAGCAGAAAGATG | TTCAGATGTTGTGGGTG |
| RORγt | AGCCTTTCCCTTTCT | CCATCATTGCTGTGTG |

2.3 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 而多组间比较前先进行方差齐性检验, 方差齐时采用 One-Way ANOVA 检验, LSD 法进行多重比较; 方差不齐时采用非参数秩和检验, 先用 Kruskal-Wallis H 检验比较总差异, 再用 Mann-Whitney U 检验进行 2 组间比较。另外, 计数资料采

用完全随机设计多样本比较的秩和检验。

3 结果

3.1 复方芩柏颗粒剂对大鼠一般情况的影响 正常对照组大鼠反应灵活, 皮毛浓密有光泽, 饮食正常, 大便成形呈褐色, 活动无明显异常改变; 模型组大鼠精神萎靡, 皮毛易脱落, 轻微竖毛, 食量减少, 便质软, 有少量黏液或伴有血便, 体重减轻; 给药组大鼠较模型组有不同程度的改善。图 1 显示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠 DAI 评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方芩柏颗粒剂组该评分显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。



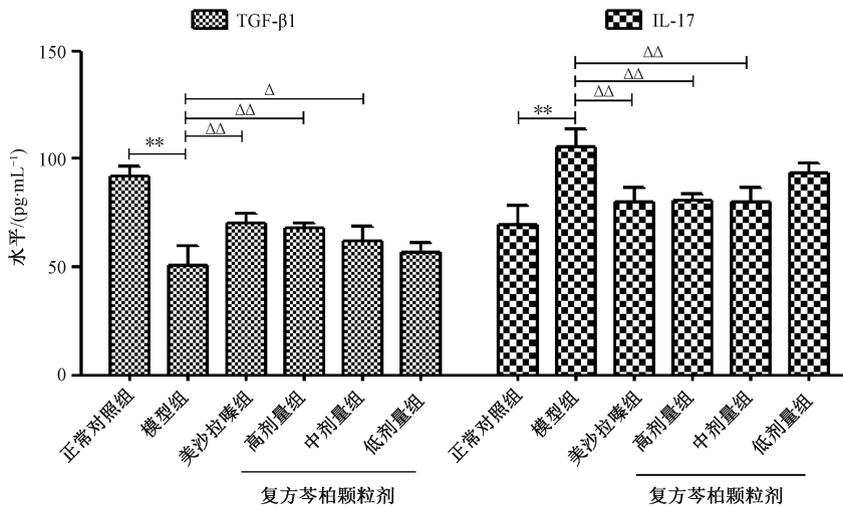
注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

图 1 各组大鼠 DAI 评分

3.2 复方芩柏颗粒剂对 TGF-β1、IL-17 水平的影响 图 2 显示, 与正常对照组比较, 模型组 TGF-β1 水平显著降低 ($P < 0.01$), IL-17 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方芩柏颗粒剂高、中剂量组前者水平显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 后者水平显著降低 ($P < 0.01$), 并呈一定量效关系。

3.3 复方芩柏颗粒剂对大鼠结肠组织病理变化的影响 肉眼显示, 正常对照组大鼠结肠纹理清晰, 无损伤; 模型组大鼠结肠黏膜表面轻度充血、水肿, 糜烂较局限, 偶可见针尖样溃疡。光镜下 (图 3) 显示, 正常对照组大鼠结肠各层组织结构完整清晰, 腺体排列整齐, 未见水肿、溃疡形成; 模型组大鼠结肠黏膜结构破坏严重, 部分区域黏膜脱落, 腺体稀疏或缺失, 排列紊乱, 充血明显, 并有局灶性出血, 细胞间质可见炎性细胞浸润广泛, 偶可见溃疡深达肌层; 给药组大鼠实施情况均有不同程度的减轻, 部分黏膜有浅表覆盖, 轻度水肿, 另一部分有肉芽组织增生, 形成瘢痕。

3.4 复方芩柏颗粒剂对 RORγt、Foxp3 蛋白表达的影响 图 4 显示, 与正常对照组比较, 模型组 RORγt 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), Foxp3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 两者比值明显失衡; 与模型组比较, 复方芩柏颗粒剂组前者蛋白表达 (除低剂量组外) 显著降低 ($P < 0.01$), 后者蛋白表达及两者比值显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 并呈一定量效关系。



注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

图2 各组 TGF-β1、IL-17 水平

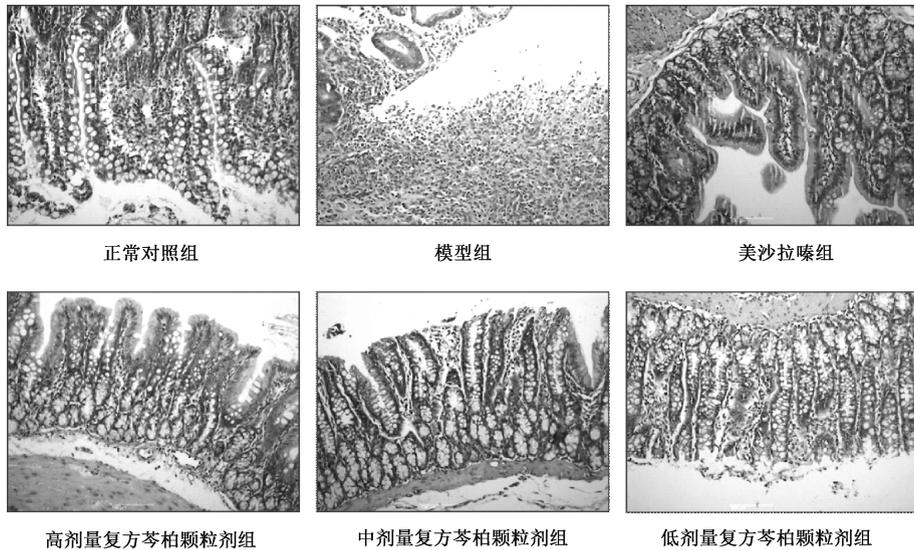


图3 各组大鼠结肠组织病理变化 (HE 染色, ×100)

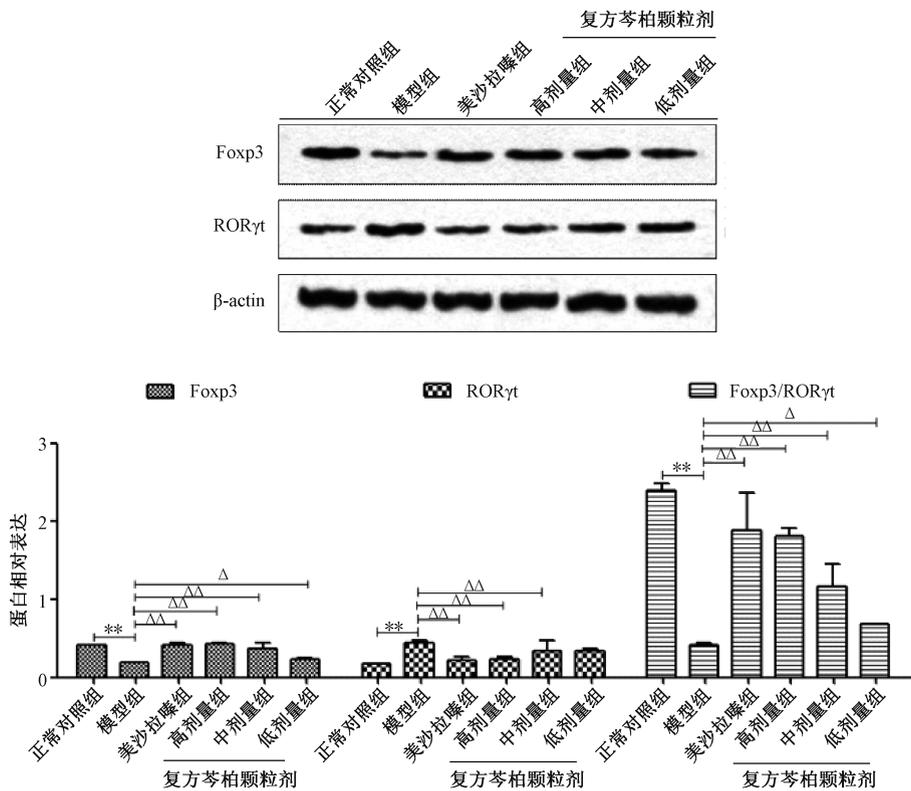
3.5 复方芩柏颗粒剂对 *RORγt*、*Foxp3* mRNA 表达的影响 图5显示,与正常对照组比较,模型组 *RORγt* mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), *Foxp3* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,复方芩柏颗粒剂组前者 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$),后者 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并呈一定量效关系。

4 讨论

IL-17 是新近发现的一种重要的促炎症细胞因子,具有强大的促炎反应活性,可通过增加细胞的通透性来促进其他前炎症因子和趋化因子产生,当它与受体结合后,可诱导活化 T 细胞和刺激成纤维细胞、巨噬细胞和上皮细胞产生多种促炎介质 (IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、一氧化氮合酶 2、单核细胞趋化蛋白-1 等),并通过联系体内适应免疫系统和固有免疫系统,介导溃疡性结肠炎等免疫疾病的发生发展过程^[10-12]。TGF- β 1 可由多种白细胞和间质细胞分泌

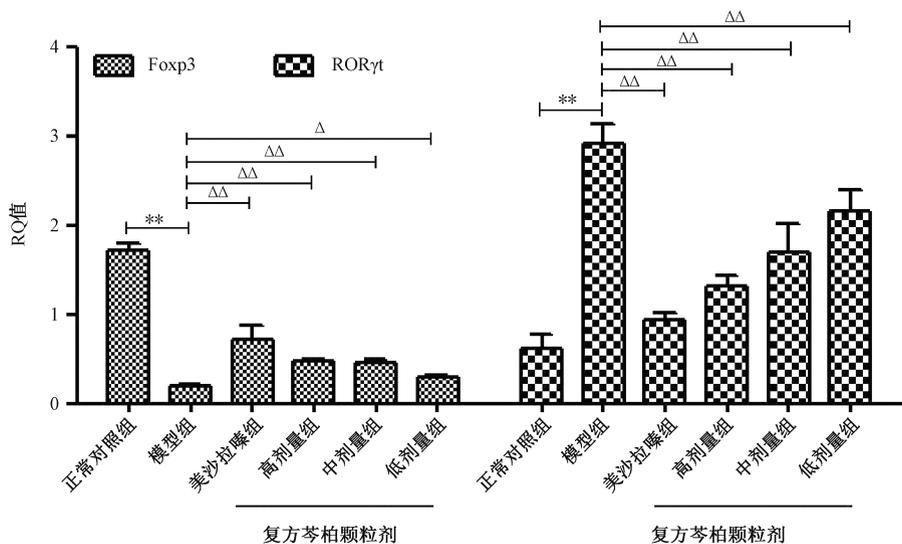
产生,是重要的免疫调节分子,能通过调节特异性转录因子 Foxp3 表达来影响 Treg 细胞分化,并与维持外周 Treg 细胞发育及功能活性密切相关,是诱导 Treg 细胞生成所必需的,当外周淋巴器官中该信号受损时, Foxp3 表达减少, Treg 抑制功能减弱,最终导致自身免疫综合征^[13-14]。目前认为, *RORγt* 和 Foxp3 分别是控制 Th17/Treg 细胞分化的特异性转录因子,其中前者在 Th17 细胞分化过程中呈持续表达状态,并控制 IL-17 表达过程;后者在 CD4+CD25+Treg 细胞分化过程中呈特异性高表达,可调控 Treg 细胞分化发育和功能,该基因突变或敲除小鼠会导致 CD4+CD25+Treg 细胞缺失或下降,伴有功能缺陷,诱发严重自身免疫反应^[15-16]。

复方芩柏颗粒剂及其制备工艺已于 2000 年获得中华人民共和国国家知识专利 (专利号 ZL941131149),是在古方止痛如神汤的基础上进行化裁,主要由黄芩、黄柏、秦艽、



注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

图4 各组 RORγt、Foxp3 蛋白表达



注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

图5 各组 RORγt、Foxp3 mRNA 表达

桃仁、防风、泽泻、当归、制大黄、玄胡、生地、槟榔 11 味中药组成，方中黄芩、黄柏清热燥湿；大黄泻火解毒，活血祛瘀；当归、生地补血活血；桃仁活血祛瘀；玄胡、槟榔活血行气止痛；防风、秦艽祛湿止痛；泽泻清热利湿，诸药合用，补泻并举，泻中有补，共奏清热利湿、行气止痛、化瘀止血之功效，主治与“湿热”“气滞”“血瘀”等病机有关的疾病。本实验发现，复方芩柏颗粒剂能在一定

程度上改善溃疡性结肠炎大鼠症状，其机制可能是通过上调 TGF-β1 表达，调控 RORγt、Foxp3 的平衡，进而下调 IL-17 表达，从而改善炎症，并呈一定剂量关系，为其临床应用推广提供实验依据。但该方对溃疡性结肠炎的作用靶点是否是多途径的尚不明确，还需要作进一步研究。

参考文献：

[1] 王真权. 慢性溃疡性结肠炎中医辨证规律研究[J]. 湖南中

- 医药大学学报, 2013, 33(5): 106-108, 112.
- [2] Wang K, Xuan X M, Tong L, *et al.* The role of Treg/Th17 and calprotectin in ulcerative colitis rat model[J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Edit)*, 2014, 45(6): 946-949.
- [3] 李军祥, 陈 誥. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(2): 105-111, 120.
- [4] 王 苹. 半夏泻心汤加减配合中药保留灌肠治疗溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 当代医学, 2013, 19(19): 153-154.
- [5] 王志斌, 陈 晨, 郭 一, 等. 清肠温中方治疗轻中度溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(1): 15-19.
- [6] 李 叶, 梁 灿, 张北平, 等. 罗云坚教授治疗溃疡性结肠炎经验[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(9): 64-66.
- [7] 王新月, 闫 昕. 溃疡性结肠炎的发病特点与“毒损肠络”病机学说[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(3): 410-414.
- [8] 贺荔枝, 尹 明, 王真权. 复方苓柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 AQP4、AQP8 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(5): 13-16, 73.
- [9] 申 睿, 刘 苗, 朱向东, 等. 中医药治疗溃疡性结肠炎实验研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(7): 1721-1725.
- [10] 何丽霞, 吴赛春, 李秀存, 等. 化痰活血方对哮喘小鼠 IL-17A 和 IL-13 的影响[J]. 中成药, 2016, 38(3): 490-494.
- [11] Machiels K, Joossens M, Sabino J, *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2014, 63(8): 1275-1283.
- [12] Pankratz S, Ruck T, Meuth S G, *et al.* CD4⁺ HLA-G⁺ regulatory T cells: Molecular signature and pathophysiological relevance[J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(9): 727-733.
- [13] Li J N, Li J X, Huang H L, *et al.* Influence of sirolimus-induced TGF- β secretion on mouse Treg cell proliferation [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 18569-18579.
- [14] Eusebio M, Kuna P, Kraszula L, *et al.* Allergy-related changes in levels of CD8⁺CD25⁺FoxP3 (bright) Treg cells and FoxP3 mRNA expression in peripheral blood: the role of IL-10 or TGF- β [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2014, 28(3): 461-470.
- [15] 李晓冰, 崔利宏, 陈玉龙, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎小鼠肠道调节性 T 细胞免疫调节作用[J]. 中成药, 2014, 36(6): 1295-1297.
- [16] 苑 伟, 杨 慧, 傅颖璐. 中药对调节性 T 细胞免疫调节功能的研究进展[J]. 中成药, 2014, 36(5): 1041-1044.

补肾益元方对运动性低血睾酮大鼠睾丸 Leydig 细胞睾酮合成酶的影响

王一蓉^{1,2}, 周志宏¹, 汤长发^{2*}, 魏 霞², 叶志文²

(1. 湖南体育职业学院, 湖南长沙 410019; 2. 湖南师范大学体育学院, 湖南长沙 410081)

摘要: 目的 探索补肾益元方对运动性低血睾酮大鼠睾丸 Leydig 细胞睾酮合成酶的影响。方法 采用逐级递增负荷跑台方案建立运动性低血睾酮大鼠模型, 40 只大鼠随机分为空白组、模型组、淫羊藿提取物组 (0.70 g/kg) 及补肾益元方低、高剂量组 (0.35、0.70 g/kg), 每组 8 只。透射电镜观察大鼠睾丸超微结构, Western blot 检测睾丸 Leydig 细胞中胆固醇合成限速酶 (HMG-CoA 还原酶、LDL-R、SR-BI)、睾酮合成限速酶 (CYP11A1、StAR) 蛋白表达。结果 补肾益元方组大鼠在透射电镜下可见 Leydig 细胞个别线粒体轻度肿胀, 内质网扩张不明显, 血清睾酮值, 睾丸 Leydig 细胞 HMG-CoA 还原酶及 StAR、CYP11A1 蛋白表达较模型组显著升高 ($P < 0.01$), 但 LDL-R、SR-BI 蛋白表达无显著变化 ($P > 0.05$)。结论 补肾益元方可能通过运动性低血睾酮大鼠睾丸 Leydig 细胞内胆固醇和睾酮、合成相关酶来影响其血睾酮浓度。

关键词: 补肾益元方; 运动性低血睾酮; 睾丸; Leydig 细胞; 睾酮合成酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2019)06-1415-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.06.045

运动性低血睾酮一直是竞技体育界最关心的问题, 长时间高负荷运动训练能引起血睾酮水平下降, 进而导致体能、运动能力降低或产生疲劳^[1], 其主要原因是 HPG 轴功

能的多个环节被抑制^[2]。目前, 在睾丸 Leydig 细胞水平层面, 因 LH/CG 受体、P450_{SCC}、 β 2-肾上腺素受体等环节改变引起睾酮降低均有报道, 但鲜有关注运动训练、营养干

收稿日期: 2018-07-19

基金项目: 湖南省财政厅教育(科研)专项(2013年); 湖南省教育厅科学研究项目(2016C041)

作者简介: 王一蓉(1982—), 女, 博士生, 副教授, 研究方向为运动营养补剂。E-mail: 896869992@qq.com

* 通信作者: 汤长发(1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为骨髓肌。E-mail: 1104755704@qq.com