

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.05.02

# 雷公藤多苷对溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜 TLR4 信号通路表达的影响

钟继红, 王章流, 刘英超, 沈雁, 方国栋  
(浙江中医药大学附属第二医院 消化内科, 杭州 310005)

**摘要:**[目的]观察雷公藤多苷对右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型结肠黏膜 LPS/TLR4 信号通路表达的影响,探讨其治疗溃疡性结肠炎的可能作用机制。[方法]BALB/c 小鼠随机分为 6 组:模型组、低、中及高剂量中药雷公藤多苷灌胃组、阴性对照组、正常对照组。采用 DSS 复制 BALB/c 小鼠溃疡性结肠炎动物模型,雷公藤多苷灌胃给药 21 d 后,采用荧光定量 PCR、western blot 法检测 TLR4 mRNA 和蛋白的表达。[结果]3 组中药灌胃组较阳性对照组 TLR4 表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),但中、高剂量中药灌胃组、阴性对照组与正常组两两之间表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。[结论]雷公藤多苷能够抑制 LPS/TLR4 信号通路的表达,抑制 UC 小鼠的炎症反应,对 UC 发病起到一定得保护作用。

**关键词:**雷公藤多苷;葡聚糖硫酸钠;溃疡性结肠炎;TLR4

**中图分类号:**R574.62 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-038X(2015)05-0307-04

## Effect of tripterygium glycosides on the expression of TLR4 in colonic mucosa of ulcerative colitis in mice

ZHONG Ji-hong, WANG Zhang-liu, LIU Ying-chao, SHEN-Yan, FANG Guo-dong

(Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310005, China)

Corresponding author: ZHONG Ji-hong, E-mail: 49747048@qq.com

**Abstract:**[Objective]To observe the effect of Tripterygium wilfordii on LPS/TLR4 signaling pathway of colon mucosa in dextran sulphate sodium(DSS)induced ulcerative colitis mice, and to explore its possible mechanisms of action. [Methods]BALB/c mice were randomly divided into six groups: model group, low, medium and high dose groups of Chinese medicine tripterygium glycosides intragastric group, negative control group and normal control group. Ulcerative colitis model was made by DSS in BALB/c mice, and treatment was 21 days. TLR4 mRNA was detected by real-time PCR and western blot. [Results]The expression of TLR4 was significantly decreased in the three groups of herbs compared with the positive control group( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between the medium and high doses of groups or between negative control group and the normal group( $P > 0.05$ ). [Conclusion]Tripterygium glycosides can suppress the LPS/TLR4 signaling pathway, and inhibit the inflammatory reaction in UC mice, thus can be effective in controlling ulcerative colitis.

**Key words:** tripterygium glycosides; dextran sulfate sodium; ulcerative colitis; TLR4

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)是一种慢性非特异性结肠炎症,其病因病机尚不十分明确,

目前普遍认为是免疫、遗传、环境及肠道菌群等多因素共同作用的结果。其中免疫功能紊乱被认为是重要致病因素之一<sup>[1-2]</sup>。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是启动炎症反应及免疫应答的重要模式识别受体,LPS/TLR4 在机体免疫反应中的重要作用得到众多学者的公认,近来 TLR4 也被认为是肠道免疫反应的一类关键介质,TLR4 在正常的结肠

收稿日期:2014-12-17

基金项目:浙江省教育厅科研资助项目(No:Y201329099)

作者简介:钟继红,女,硕士,主治医师,研究方向:中西医结合对消化系疾病的研究

通讯作者:钟继红, E-mail: 49747048@qq.com

黏膜中呈现低表达,而在 UC 的结肠黏膜中则呈现异常的高表达<sup>[3-4]</sup>。TLRs 介导的信号转导途径中 TLRs/NF-κB 通路已基本阐明,NF-κB 可上调肠黏膜中致炎细胞因子(如 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、GM-CSF 和 TNF-α)的表达,加重肠黏膜的炎症<sup>[5-7]</sup>。雷公藤多苷是从中药雷公藤中提取出来的有效成分,它具有很强的抗炎和免疫调节作用,常用于治疗 UC,疗效确切<sup>[8-9]</sup>。但其对溃疡性结肠炎结肠黏膜 TLR4 表达影响的研究报道较少。本文拟从 LPS/TLR4 信号通路来阐明雷公藤多苷抗溃疡性结肠炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 BALB/c 小鼠 60 只,8 周龄,体重(20 ± 2)g 购自浙江中医药大学动物实验中心,动物生产许可证号:SYXK(浙)2003-2003。

1.2 主要药品及试剂

右旋葡聚糖硫酸钠(DSS):购于 Sigma-Aldrich 公司(Fluka: 5000 MW, 31404),应用时配成 5% DSS 溶液(5 mg DSS 溶于 100 ml PBS)。雷公藤多苷片:浙江得恩德制药有限公司,批号:Z33020422,应用时按人-小鼠体表面积换算,分别用蒸馏水配制成低、中、高剂量的雷公藤多苷混悬液,即:9.01 mg/kg · d<sup>-1</sup>,27.03 mg/kg · d<sup>-1</sup>,81.09 mg/kg · d<sup>-1</sup>。

1.3 方法

1.3.1 实验动物的分组及处理 小鼠适应性喂养 7 d 后用于实验,随机分为 6 组,每组 10 只,即模型组(A 组),低剂量组(B 组)、中剂量组(C 组)及高剂量中药灌胃组(D 组),阴性对照组(E 组),正常对照

组(F 组)。第 1-7 天 A-D 组小鼠自由饮用 5% DSS 溶液,E-F 小鼠自由饮用纯净水,同时,B-D 组每天分别用低、中、高剂量雷公藤多苷混悬液 0.4 ml 灌胃,A 组小鼠每天用等体积的生理盐水灌胃。造模之日起,每天观察小鼠大便性状和便血情况,活动、体重等,模型建立成功的判定标准根据稀便、大便带血、体重减轻等症状和形态学改变确定。造模开始后第 8 天各组随机抽杀一只小鼠取同水平段的远端结肠组织做病理组织切片,观察结肠病变情况。第 8 天开始,各组小鼠均自由饮用纯净水,其中 A 组小鼠继续每天用生理盐水灌胃,B-D 组每天分别低、中、高剂量雷公藤多苷混悬液灌胃,1 次/d,第 22 天,除正常对照组外,其余各组均腹腔注射 LPS 100 μg,24 h 后取各组同水平段的远端结肠标本行相关指标检测。

1.3.2 结肠组织形态学检测 肉眼观察结肠组织黏膜及浆膜面的变化。取新鲜结肠组织一块,修整后大小约 1.0 cm × 1.0 cm × 0.2 cm,置于包埋盒于 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,3~4 μm 厚,连续切片,HE 染色光镜观察组织形态学变化。

1.3.3 TLR4 测定 采用 RT-PCR 方法,检测 TLR4 的表达水平。结肠组织总 RNA 按 Trizol 法提取,使用分光光度计在 260/280 nm 处检测总 RNA 的浓度之后,进行反转录。反转录反应体系为 10 μl,具体步骤参照 RT 试剂盒说明,PCR 扩增反应体系 25 μl,引物序列和反应条件见表 1。取 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统成像,目标 mRNA 的表达使用内参 Human 18 S 进行校正(见表 1)。

表 1 PCR 有关参数

基因名称	基因序列号	引物序列	PCR 反应条件
Human TLR4	NM_021297.2	5'-CACCTGGGGCTCTGCTATGGA-3'	95℃, 1 min; 40 个循环;
		5'-CCCCTGGAAAGGAAGGTGTC-3'	95℃, 10 s; 64℃, 25 s

1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-t 检验及 Dunnett-t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的一般状况

造模后第 3 天 A~D 组小鼠均出现少动,进食少,毛色失去光泽,精神倦怠,出现不同程度的腹泻,

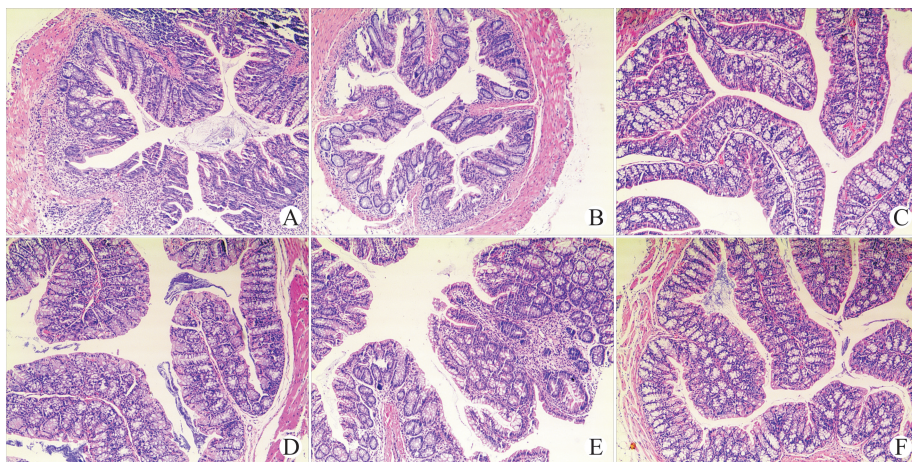
肉眼便血,肛门血染,体重下降明显,但 B-D 组较 A 组上述症状减轻;E~F 组小鼠大便、体重、毛发、饮食、活动等一般状况均正常,未出现死亡现象。

2.2 各组小鼠结肠组织病理改变

A 组:镜下可见结肠黏膜溃疡,组织明显水肿、充血及大量炎性细胞浸润,以中性粒细胞为主;B 组:镜下也可见结肠黏膜溃疡,仍有较明显的组织水肿和大量炎性细胞浸润;C、D 组:镜下可见结肠黏膜溃疡较少并可见已愈合的溃疡组织,组织水肿和

充血明显减轻,炎性细胞浸润明显减少;E、F组:镜下可见结肠黏膜完整,光滑,腺体层次清楚、清晰可

见,未见糜烂、溃疡及中性粒细胞浸润等(见图1)。



A:模型组;B:低剂量雷公藤多苷组;C:中剂量雷公藤多苷组;D:高剂量雷公藤多苷组;E:阴性对照组;F:正常组。

图1 各组小鼠结肠病理学改变( $\times 100$ )

### 2.3 各组小鼠结肠组织 TLR4 的表达水平

A、B、C、D组较E、F组TLR4表达水平均升高,同时B、C、D组较A组TLR4表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),但C组与D组、E组与F组表达水平差异无统计学意义(见表2)。

表2 各组小鼠结肠组织 TLR4 表达水平  $\bar{x} \pm s$

组别	TLR4 相对表达量
A组	100.54 $\pm$ 7.94
B组	84.63 $\pm$ 6.34 <sup>1)</sup>
C组	59.87 $\pm$ 7.01 <sup>1)</sup>
D组	56.05 $\pm$ 8.59 <sup>1)</sup>
E组	2.11 $\pm$ 0.31
F组	1.01 $\pm$ 0.19

与A组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

迄今为止,UC的发病机制仍未明确。目前普遍认为UC是免疫、遗传、环境及肠道菌群等多因素共同作用的结果,其中免疫功能紊乱被认为是重要致病因素之一。目前临床上常用的治疗UC的药物主要包括水杨酸类、糖皮质激素和免疫抑制剂,但三者用于维持缓解治疗时,存在不良反应多,复发率高,难于长期服用等缺点,有必要寻找一种新的高效的治疗方法以提高治疗效果。雷公藤多苷是从中药雷公藤中提取出来的有效成分,它具有很强的抗炎及免疫调节作用,能够抑制多种细胞因子的表达,如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- $\alpha$

等<sup>[10]</sup>。有研究表明雷公藤多苷能够有效抑制小鼠结肠急性炎症反应,但其具体作用机制仍有待进一步研究。

TLR是启动炎症反应及免疫应答的重要模式识别受体。随着黏膜免疫系统的深入研究,人们发现TLRs家族中的TLR4参与了UC的发生发展。TLR4是天然免疫系统中的跨膜受体,可非特异性地识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecule pattern, PAMPs)并与之结合,启动下游的信号转导通路,最终导致核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)的激活引发IL-1、TNF- $\alpha$ 等炎症因子的释放,介导炎症的发生<sup>[11]</sup>。TLR4介导炎症发生的经典信号转导通路主要是通过识别LPS,与髓样细胞分化蛋白2(myeloid differentiation protein 2, MD2)及CD14两个分子形成MD2-TLR4-CD14复合体,并通过髓样分化分子88(myeloid differentiation factor MyD88)依赖性信号转导路径和MyD88非依赖性信号转导路径激活NF- $\kappa$ B,引起炎症因子的释放,介导炎症的发生<sup>[12]</sup>。大量的研究显示UC动物实验模型和UC患者结肠黏膜中TLR4的高表达<sup>[13]</sup>,而在人正常结肠黏膜上皮细胞TLR4几乎不表达<sup>[14]</sup>,提示TLR4参与UC的发生发展,且发挥重要作用,但TLR4与UC的研究尚处于初步阶段,具体的信号转导途径及各个关键分子相互间的作用等研究还有待进一步研究。

本实验是在以上研究基础上,成功复制了与人类UC相似的DSS所致的小鼠结肠炎模型,以TLR4为检测指标,从而研究雷公藤多苷抗炎及调

控细胞因子平衡的信号通路及其作用机制。实验结果显示:A、B、C、D组较E、F组TLR4表达水平均升高,同时B、C、D组较A组TLR4表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),并且各组间两两比较后发现C组与D组、E组与F组表达水平差异无统计学意义。本实验结果表明DSS溃疡性结肠炎模型小鼠在DSS诱导后,结肠组织中TLR4含量明显升高,提示TLR4高表达水平参与了UC的发生发展;而雷公藤多苷能显著抑制DSS诱导的小鼠结肠急性炎症反应,经雷公藤多苷干预后,使得TLR4的含量下降,表明雷公藤多苷能够抑制LPS/TLR4介导的信号传导通路。因此雷公藤多苷治疗UC具有一定的应用前景,但应进一步深入研究雷公藤多苷对LPS/TLR4信号转导通路具体作用机制,挖掘信号转导通路中的关键分子,为临床治疗UC提供新的治疗靶标和更为有效的药物。

#### 参考文献

- [1] NEUMAN M G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease[J]. *Transl Res*, 2007, 149:173—184.
- [2] 赵曼,高峰. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 16(10):3160—3165.
- [3] MIYAKE K. Innate recognition of lipopolysaccharide by toll-like Receptor 4-Md-2[J]. *Trends Microbiol*, 2004, 12:186—192.
- [4] KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptor sand inflate immunity[J]. *Biochem BioPhys ResCommun*, 2009, 388:621—625.
- [5] HUANG C, JACOBSON K, SCHALLER M D. MAP kinases and cell migration[J]. *Cell Sci*, 2004, 117:4619—4628.
- [6] 赵莉,苏双全,夏林,等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织TLR2、TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路调节的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(5):518—521.
- [7] ZHANG J Y, JIN H, WANG G F, et al. Methyl-1-hydroxy-2-naphthoate, a novel naphthol derivative, inhibits lipopolysaccharide induced inflammatory response in macrophages via suppression Of NF-KB, JNK and P38 MAPK pathways[J]. *Inflamm Res*, 2011, 60: 851—859.
- [8] 王坤明,来旭华,郑伟明,等. 雷公藤多甙治疗溃疡性结肠炎临床研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2005, 19(4):336—336.
- [9] 冯胜刚. 雷公藤多甙对细胞免疫和临床肾脏病免疫的影响[J]. *西部医学*, 2003, 1(4):367—369.
- [10] 周泠,刘卓志. 雷公藤多甙栓对溃疡性结肠炎大鼠TNF- $\alpha$ 和IL-8的影响[J]. *遵义医学院学报*, 2006, 29(1):31—33.
- [11] LEVIN A, SHIBOLET O. Toll-like receptors in inflammatory bowel disease—stepping into uncharted territory[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 5149—5153.
- [12] SIDDIQUE I, KHAN I. Mechanism of regulation of Na-H exchanger in inflammatory bowel disease:role of TLR-4 signaling mechanism[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56: 1656—1662.
- [13] 谢晶日,张冰. Toll样受体4与溃疡性结肠炎相关性研究[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(7):1452—1453.
- [14] ABREU M T, VORA P, FAURE E, et al. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide[J]. *J Immunol*, 2001, 167: 1609—1616.