

• 论著-实验研究 •

基于 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路探讨祛瘀生新方治疗溃疡性结肠炎小鼠的作用机制*

吴闯¹ 韩昌鹏² 汪庆明¹ 张海岩¹ 黄焯¹ 茅闻婧¹ 杨巍¹

[摘要] 目的:研究祛瘀生新方对溃疡性结肠炎(UC)小鼠的治疗效果以及对 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路的调节作用。方法:将 36 只小鼠随机分为实验组(祛瘀生新组)、模型组、阳性对照组(美沙拉嗪组)、空白组、中药拆方 1 组(生新组)、中药拆方 2 组(祛瘀组),6 只/组,采用 3.5% 葡聚糖硫酸钠盐(DSS)溶液自由饮水法制备 UC 小鼠模型,7 d 后进行相应药物干预,每天称重小鼠,评估 DAI 积分,灌胃 7 d 后处死小鼠取结肠组织并测量长度。对结肠进行苏木精-伊红染色观察各组小鼠结肠组织形态变化及病理学评分情况。采用 RT-qPCR、ELISA 检测并比较各组小鼠结肠中 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β mRNA 及其蛋白表达水平。结果:干预前非空白组小鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$);祛瘀生新组、模型组、美沙拉嗪组、生新组、祛瘀组小鼠结肠长度明显短于空白组($P<0.05$);中药组、美沙拉嗪组、空白组与祛瘀组 DAI 评分低于模型组($P<0.05$);各组病理评分均低于模型组($P<0.05$);各组 RIP1、RIP3、IL-1 β mRNA 明显低于模型组($P<0.05$);其中祛瘀组 NLRP3 mRNA 与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);祛瘀生新组与美沙拉嗪组 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β mRNA 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);祛瘀组 IL-1 β mRNA 低于生新组($P<0.05$);生新组 NLRP3 mRNA 低于祛瘀组($P<0.05$)。各组 RIP1、NLRP3、IL-1 β 与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);而祛瘀生新组 RIP3、IL-1 β 与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:祛瘀生新方对 UC 有一定的治疗作用,其中祛瘀中药和生新中药需要配合使用方能达到更好效果,可能是通过 RIP1/RIP3/NLRP3 通路抑制 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β 的表达控制炎症而起作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎;祛瘀生新方;RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2021.02.08

[中图分类号] R574.62 **[文献标志码]** A

Mechanism of Quyushengxin decoction for treating ulcerative colitis in mice: the role of RIP1/RIP3/NLRP3 pathway

WU Chuang¹ HAN Changpeng² WANG Qingming¹ ZHANG Haiyan¹
HUANG Ting¹ MAO Wenjing¹ YANG Wei¹

(¹Department of Anorectal, Shanghai Baoshan District Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai, 201999, China; ²Department of Anorectal, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

Corresponding author: YANG Wei, E-mail: 13917198396@136.com

Abstract Objective: To study the effect of Quyushengxin(QYSX) decoction on UC mice and the regulation of RIP1/RIP3/NLRP3 pathway. **Methods:** Thirty-six mice were randomly divided into experimental group(QYSX group), model group, positive control group(Mesalazine group), blank group, TCM disassembled Formula 1 group(QY group), and TCM disassembled formula 2 group(SX formula group), 6 mice per group. UC mice model was prepared by 3.5% DSS drinking water method. Corresponding drug treatment was applied to mice on the 7th day. Implementing daily mice weighting and regular DAI scores evaluation. The colon tissue was dissected and the length was measured, the morphological changes was observed with HE staining and pathological scores of each group was rated. The mRNA and protein expression level of RIP1, RIP3, NLRP3, IL-1 β were tested by RT-qPCR and ELISA. **Results:** Weight of non-blank group appeared no significant difference before treatment($P<0.05$). The colon length of QYSX group, Model group, Mesalazine group, SX group, QY group was clearly shorter than the blank group($P<0.05$). The DAI scores of QYSX group, MSLZ group, blank group and SX

*基金项目:国家自然科学基金(No:81704078);国家自然科学基金(No:81874468);上海市中医药三年行动计划项目[No:ZY(2018-2020)-CCCX-2004-09]

¹上海市宝山区中西医结合医院肛肠科(上海,201999)

²上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肛肠科

通信作者:杨巍,E-mail:13917198396@136.com

group was significantly lower than model group ($P < 0.05$). Pathological scores, RIP1, RIP3, IL-1 β mRNA of other groups(except Model group) was significantly lower than Model group ($P < 0.05$). NLRP3mRNA of QY group showed consistent results compared to model group ($P > 0.05$). There was no differentiated results showed on RIP1, RIP3, NLRP3, IL-1 β mRNA between QYSX group and Mesalazine group ($P > 0.05$). IL-1 β mRNA of QY group showed lower than SX group ($P > 0.05$). NLRP3mRNA of SX group showed lower than QY group ($P > 0.05$). RIP1, NLRP3, IL-1 β of other groups showed significantly differences with model group ($P < 0.01$). However, RIP3, IL-1 β of QYSX group showed no major difference with Blank group ($P > 0.05$). **Conclusion:** QYSX formula has certain therapeutic effect on UC. Better therapeutic effect showed by using combination of QYSX Decoction and QuyuShengxin decoction, which could be resulted by inhibiting the expression of RIP1, RIP3, NLRP3 and IL-1 β through RIP1/RIP3/NLRP3 pathway to control inflammation.

Key words ulcerative colitis; Quyu Shengxin decoction; RIP1/RIP3/NLRP3 pathway

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以结肠黏膜炎症和溃疡为特征的慢性肠道炎症性疾病, 其发病机制不明确^[1]。我国发病率逐年增高^[2]。UC 的临床特征主要是结肠溃疡, 其病理特征为结肠黏膜中隐窝炎症浸润、化脓, 杯状细胞坏死缺失, 黏膜层屏障功能减退。有研究发现, UC 的发病机制可能与相关的细胞坏死因子、炎性因子等有关^[3]。祛瘀生新方^[4]是上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院王振宜教授的经验方, 该方是根据“久病必虚, 久病必瘀”的病机立法, 以补虚祛瘀, 生新敛疮为治法, 方重以黄芪、鸡眼草为君药, 补虚扶正、清热利湿, 以太子参、白术、地锦草、桃仁为臣药, 能健脾燥湿、活血化瘀, 并配以生地黄、川芎清热行气, 助君药扶正祛邪, 共奏扶正祛瘀, 标本兼顾之功, 具有补虚祛瘀、化腐生新的功效, 长期应用于临床达 10 年之久, 疗效显著。有研究发现, 受体作用相互蛋白激酶 1 (receptor interacting protein kinase, 1 RIP1) 与受体作用相互蛋白激酶 3 (receptor interacting protein kinase, 3 RIP3) 在炎症性肠病中发挥着重要作用, NLRP3、IL-1 β 在 UC 患者结肠黏膜及血清中明显升高^[6-7]。本课题组基于此, 研究祛瘀生新方对 UC 模型小鼠的治疗效果及对 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路的调控机制, 旨在探讨祛瘀生新方治疗 UC 的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验对象

实验小鼠为 SPF 级 B6129/C 小鼠, 共 36 只, 雌雄各半, 6~8 周龄。

1.2 主要实验试剂及仪器

实验中所用中药材由上海市宝山区中西医结合医院中药房提供。祛瘀生新方: 黄芪 45 g, 太子参 30 g, 白术 15 g, 生地黄 15 g, 鸡眼草 20 g, 地锦草 20 g, 桃仁 15 g, 川芎 15 g; 祛瘀方: 桃仁 15 g, 川芎 15 g, 鸡眼草 20 g, 地锦草 20 g; 生新方: 黄芪 45 g, 太子参 30 g, 白术 15 g, 生地黄 15 g; 将各方中药水煎高浓度梯度 (75%、95%) 乙醇提纯有效成分, 祛瘀生新方制成含生药浓度为 1.05 g/mL 的中药制剂, 祛瘀方为 0.42 g/mL, 生新方为

0.63 g/mL。将美沙拉嗪片溶于蒸馏水中制备成悬浊液, 浓度为 0.018 g/mL。

相对分子质量 50 000 的葡聚糖硫酸钠 (DSS)、Trizol 试剂、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II、EPS-300 电泳仪、2720 Thermal Cycle PCR 仪、QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统、3500 数码凝胶图像分析系统。

小鼠 RIP1 Elisa kit、小鼠 RIP3 Elisa kit、小鼠 DRP1 Elisa kit、小鼠 NLRP3 Elisa kit、小鼠 IL-1 β Elisa kit、小鼠 IL-18 Elisa kit。

1.3 实验方法

1.3.1 分组 将 36 只小鼠自由饲养 7 d 后随机分为实验组 (祛瘀生新方)、中药拆方 1 组 (生新方)、中药拆方 2 组 (祛瘀方)、阳性对照组 (美沙拉嗪)、模型组、空白组, 每组 6 只。

1.3.2 造模 按照 3.5% DSS 自由饮水法制备 UC 小鼠模型^[8]: 除空白组外每组小鼠给予 3.5% DSS 溶液自由饮水; 空白组饮用蒸馏水, 连续饮用 7 d, 每组常规饮食。造模 7 d 后造模小鼠均出现腹泻、便血、体重减轻, 每组随机取 1 只小鼠处死, 剖取结肠, 10% 中性甲醛固定, 病理检查以验证 UC 模型是否成功。

1.3.3 干预 按照小鼠与人药物公式 ($D_{鼠} = D_{人} \cdot R_{人鼠} \cdot S_{鼠}$ [$163/60 \text{ kg} \times 6.17 \times (W_{鼠}/150) 1/3$]) 计算各组小鼠灌胃量, 每只小鼠灌胃 0.5~0.8 mL, 中药组灌胃对应中药溶液, 模型组不灌胃, 空白组灌胃生理盐水, 每组小鼠连续灌胃 7 d, 隔天称重小鼠, 记录小鼠大便性状及便血情况。

1.3.4 标本采集 在给药第 7 天, 采用腹腔注射戊巴比妥麻醉小鼠后, 解剖腹腔, 取下距肛门 2 cm 结肠组织长度 3~5 cm, 测量长度, 冰生理盐水中反复冲洗后取病变最明显部分分别放置 10% 中性甲醛或液氮中保存备用。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 小鼠疾病活动指数评分 参考疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分标准记录小鼠

积分,见表1。

1.4.2 结肠组织病理评分 取每组小鼠标本制成病理切片,苏木精-伊红染色后显微镜观察组织病变情况,病理评分见表2。

表1 DAI评分标准

评分	体重降低/%	大便性状	大便出血
0	0	正常	正常
1	1~5	松散	隐血阳性+
2	5~10	松散	隐血阳性++
3	10~15	稀便	肉眼血便+++
4	≥15	水样稀便	严重血便++++

注:3项计分累加为最终评分结果。

表2 组织病理评分标准

评分项目	评分等级	描述
炎性细胞浸润情况	0	黏膜固有层散在的炎性细胞
	1	黏膜固有层炎性细胞增加
	2	炎性细胞聚集并侵入黏膜下层
黏膜损伤	3	炎性细胞透壁
	0	黏膜规则,形态正常
	1	离散的上皮损伤
腺窝损伤	2	表面的黏膜腐蚀或病灶溃疡
	3	黏膜损伤或扩大到肠壁深层
	0	腺窝形态正常
	1	基部1/3损伤
	2	基部2/3损伤
	3	只有表面上皮完整
	4	腺窝完全消失

1.4.3 RT-PCR检测结肠组织中RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β mRNA的表达水平 RNA使用

Trizol进行抽提, RNA质控采用Qubit2.0和琼脂糖凝胶电泳检测。按照每20 μ L反转录体系加入1 μ g的Total RNA来配制反应体系,首先去除基因组DNA,反应体系如下:5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ L、gDNA Eraser 1 μ L、Total RNA 1 μ g、RNase Free ddH₂O x μ L,将反应体系于42 $^{\circ}$ C反应2 min后转移至冰上,并用新的RNase Free离心管配制反转录 Master Mix;然后将反应液分装到每个已去除基因组DNA的反应管中,每管10 μ L,混匀后于37 $^{\circ}$ C反应15 min,85 $^{\circ}$ C反应5 s,获得cDNA。将cDNA样本稀释1倍后作为模板上机检测,每个样本设置3个复孔,于QuantStudio 6 Flex实时荧光定量PCR系统中进行反应。反应结束获得RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β mRNA的循环阈值(Ct),采用 $\Delta\Delta$ Ct($\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct - Δ Ct_{基础值}, Δ Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参})方法分析,根据 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}公式计算基因的相对表达量,见表3。

1.4.4 ELISA检测组织中RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β 的表达水平 按照ELISA kit试剂盒操作流程提取组织中蛋白,采用双抗体夹心法测定相应蛋白水平:用纯化的小鼠蛋白抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入蛋白,再与HRP标记的抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物TMB显色。TMB在HRP酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。用酶标仪在450nm波长下测定吸收度(OA值),通过标准曲线计算样品中小鼠蛋白浓度。

1.5 统计学处理

采用SPSS 18.0分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验或单因素方差分析,计数资料采用 χ^2 检验。以P < 0.05为差异有统计学意义。

表3 引物序列

项目	上游引物	下游引物
RIP1	5'-CCTTCTTGCCAGGAGAATGA-3'	5'-CTCTGAGGCGATCTGACGAC-3'
RIP3	5'-CGTAGACGTCGGGTTCCAG-3'	5'-ACCAGTAGGCCATAACTTGACA-3'
NLRP3	5'-TCTGCACCCGACTGTA AAC-3'	5'-CACCAACTGTAGGCTCTGC-3'
IL-1 β	5'-ATAGGCTCATCTGGGATCCTCT-3'	5'-ACAGGTCATTCTCATCACTGTCAA-3'
β -actin	5'-GACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'	5'-CCACAGGATTCCATACCCAAGA-3'

2 结果

2.1 各组小鼠结肠形态改变情况

祛瘀生新组:未见糜烂或溃疡,结肠色泽稍红润,质地稍柔软,长度变短;美莎拉嗪组:未见糜烂或溃疡,结肠色泽苍白质地欠柔软,长度变短;模型组:可见黏膜表面少许充血,未见糜烂或溃疡,结肠色泽苍白,质地欠柔软及弹性,长度明显变短;空白

组:小鼠结肠色泽红润、柔软,长度明显较其他组长;生新组:可见糜烂,未见溃疡,结肠色泽苍白,质地稍柔软,长度变短;祛瘀组:未见糜烂或溃疡,结肠色泽苍白质地欠柔软,长度变短。见图1。

2.2 各组小鼠病理情况比较

祛瘀生新组小鼠结肠苏木精-伊红染色显示:组织黏膜层局部肠腺结构消失,黏膜上皮细胞完

整,固有层可见少量淋巴细胞浸润(黑色箭头),未见其他明显异常,如图 2a。美沙拉嗪组可见组织黏膜层损伤,局部黏膜上皮及肠腺结构消失,被增生的结缔组织取代(黑色箭头),损伤侵及黏膜下层,黏膜层及黏膜下层均可见炎性细胞浸润(红色箭头),如图 2b。模型组显示:组织黏膜层损伤,少量上皮细胞脱落(黄色箭头),局部肠腺结构消失,被增生的结缔组织取代(黑色箭头),少量上皮细胞坏死,胞核固缩,细胞呈空泡状(红色箭头),如图 2c。空白组显示:组织结构完整,黏膜上皮细胞未见脱落,肠腺数量丰富,排列紧密,未见明显异常,如图 2d。生新组显示:组织黏膜层损伤,少量上皮细胞脱落(黄色箭头),局部肠腺结构消失,被增生的结缔组织取代(黑色箭头),损伤侵及黏膜下层,黏膜层及黏膜下层均可见炎性细胞浸润(红色箭

头),如图 2e。祛瘀组:组织黏膜层损伤,局部肠腺排列疏松,间质可见少量结缔组织增生(黑色箭头),损伤侵及黏膜下层,黏膜层及黏膜下层均可见炎性细胞浸润(红色箭头),见图 2f。

2.3 各组小鼠体重、结肠长度、DAI 及病理评分比较

祛瘀生新组、美沙拉嗪组、模型组、生新组与祛瘀组小鼠干预前体重两两比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$);祛瘀生新组、美沙拉嗪组、模型组、生新组与祛瘀组结肠长度均明显短于空白组 ($P < 0.05$);生新组结肠长度明显长于模型组 ($P < 0.05$);生新组与其他组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。祛瘀生新组、美沙拉嗪组、空白组与生新组 DAI 评分低于模型组 ($P < 0.05$);各组病理评分均低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 4。

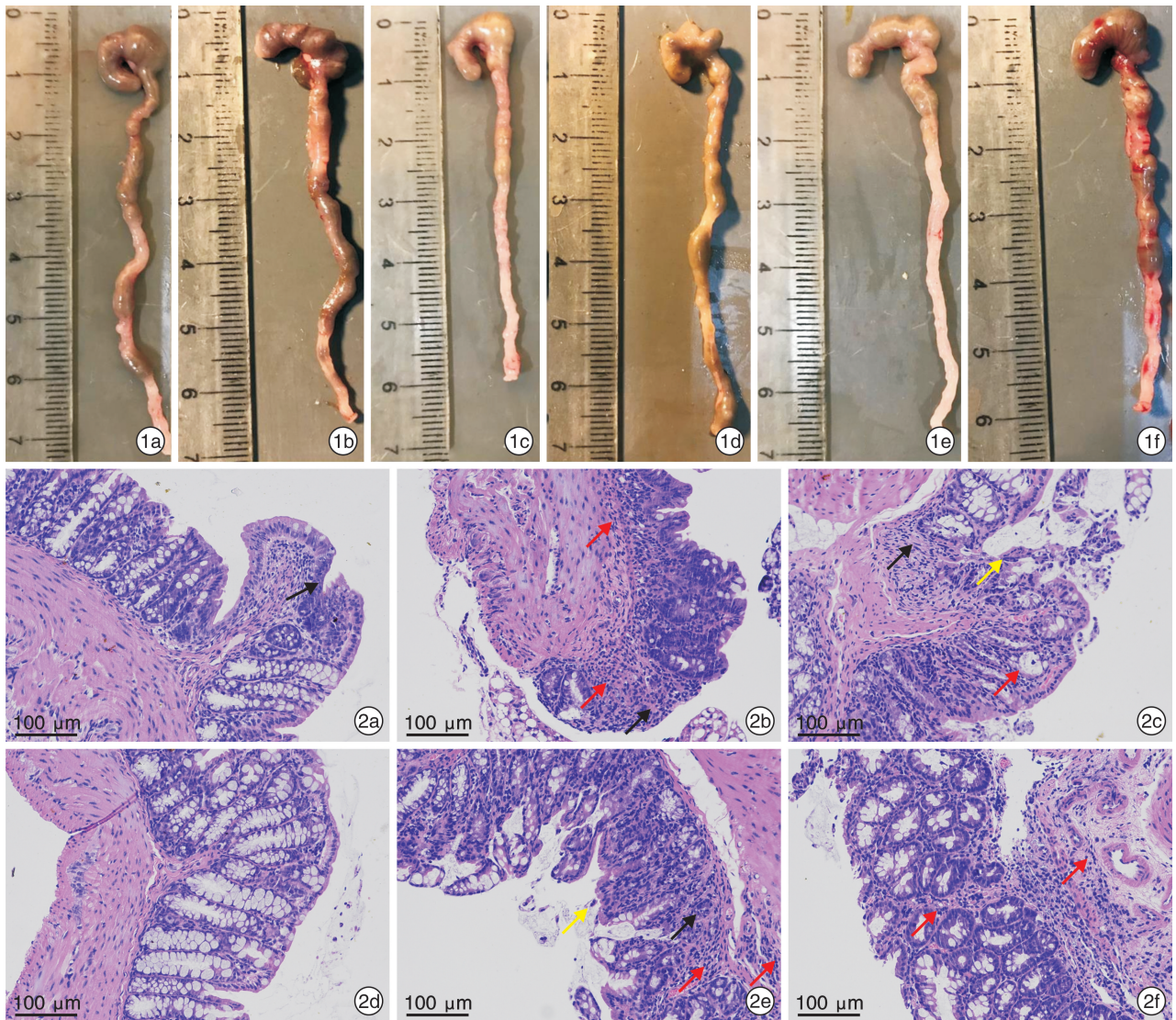


图 1 各组小鼠结肠形态 1a:祛瘀生新组;1b:美沙拉嗪组;1c:模型组;1d:空白组;1e:生新组;1f:祛瘀组; 图 2 各组小鼠苏木精-伊红染色 2a:祛瘀生新组;2b:美沙拉嗪组;2c:模型组;2d:空白组;2e:生新组;2f:祛瘀组。

2.4 各组小鼠 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β mRNA 的表达水平情况

各组 RIP1、RIP3、IL-1 β mRNA 明显低于模型组 ($P < 0.05$); 祛瘀生新组、美莎拉嗪组、空白组、祛瘀组 NLRP3mRNA 明显低于模型组 ($P < 0.01$); 祛瘀生新组 RIP1mRNA、RIP3mRNA、IL-1 β mRNA 明显低于祛瘀组、生新组 ($P < 0.05$); 祛瘀生新组 NLRP3mRNA 低于生新组 ($P < 0.05$); 美莎拉嗪组 RIP1mRNA、IL-1 β mRNA 低于祛瘀组 ($P < 0.05$)、美莎拉嗪组 RIP3mRNA、NLRP3mRNA 低于生新组 ($P < 0.05$); 生新组 IL-1 β mRNA 低于祛瘀组 ($P < 0.05$); 祛瘀组 NL-

RP3mRNA 低于生新组 ($P < 0.05$)。见表 5。

2.5 各组小鼠 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β 的表达水平情况

各组 RIP1、NLRP3、IL-1 β 均低于模型组 ($P < 0.01$); 各组 RIP1、NLRP3 均高于空白组 ($P < 0.05$); 美莎拉嗪组、模型组、生新组、祛瘀组 RIP3 均高于空白组 ($P < 0.05$); 祛瘀生新组 RIP3 与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 美莎拉嗪组、模型组、生新组、祛瘀组 IL-1 β 均高于空白组 ($P < 0.05$); 祛瘀生新组 IL-1 β 与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 6。

表 4 各组小鼠干预前体重、第 7 天结肠长度、DAI 及病理评分 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	干预前体重/g	结肠长度/mm	DAI/分	病理评分/分
祛瘀生新组	6	21.950 \pm 0.361	53.667 \pm 2.422 ²⁾	7.33 \pm 1.211 ¹⁾	6.67 \pm 1.033 ¹⁾
美莎拉嗪组	6	22.350 \pm 0.509	54.667 \pm 2.503 ²⁾	7.17 \pm 1.169 ¹⁾	6.67 \pm 0.816 ¹⁾
模型组	6	21.867 \pm 0.862	54.333 \pm 3.14 ²⁾	9.00 \pm 0.894	9.00 \pm 1.265
空白组	6	25.667 \pm 0.763	65.667 \pm 5.609	0.00 \pm 0.000	0.00 \pm 0.000 ¹⁾
生新组	6	22.100 \pm 0.936	60.833 \pm 1.941 ¹⁾²⁾	7.50 \pm 1.049 ¹⁾	6.67 \pm 0.816 ¹⁾
祛瘀组	6	22.333 \pm 0.771	55.500 \pm 2.429 ²⁾	8.00 \pm 1.414	7.33 \pm 1.033 ¹⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与空白组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

表 5 各组小鼠 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β mRNA 表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	RIP1 mRNA	RIP3 mRNA	NLRP3 mRNA	IL-1 β mRNA
祛瘀生新组	6	1.921 \pm 0.194 ¹⁾²⁾	1.257 \pm 0.310 ¹⁾	3.693 \pm 0.402 ¹⁾²⁾	1.063 \pm 0.544 ¹⁾
美莎拉嗪组	6	2.185 \pm 0.171 ¹⁾²⁾	1.564 \pm 0.496 ¹⁾²⁾	4.314 \pm 0.376 ¹⁾²⁾	1.665 \pm 0.556 ¹⁾
模型组	6	3.635 \pm 0.451 ²⁾	4.482 \pm 0.654 ²⁾	9.651 \pm 1.772 ²⁾	6.100 \pm 0.808 ²⁾
空白组	6	1.000 \pm 0.354 ¹⁾	1.000 \pm 0.151 ¹⁾	1.000 \pm 0.464 ¹⁾	1.000 \pm 0.644 ¹⁾
生新组	6	2.613 \pm 0.533 ¹⁾²⁾	2.120 \pm 0.391 ¹⁾²⁾	7.475 \pm 1.608 ²⁾	2.285 \pm 0.452 ¹⁾²⁾
祛瘀组	6	2.691 \pm 0.429 ¹⁾²⁾	1.885 \pm 0.424 ¹⁾²⁾	4.084 \pm 0.865 ¹⁾²⁾	4.237 \pm 1.209 ¹⁾²⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与空白组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

表 6 各组小鼠 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β 表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	RIP1	RIP3	NLRP3	IL-1 β
祛瘀生新组	6	0.395 \pm 0.071 ¹⁾²⁾	0.414 \pm 0.120 ¹⁾	0.419 \pm 0.087 ¹⁾²⁾	0.415 \pm 0.072 ¹⁾
美莎拉嗪组	6	0.459 \pm 0.064 ¹⁾²⁾	0.497 \pm 0.126 ²⁾	0.500 \pm 0.114 ¹⁾²⁾	0.464 \pm 0.085 ¹⁾²⁾
模型组	6	0.612 \pm 0.112 ²⁾	0.590 \pm 0.087 ²⁾	0.769 \pm 0.175 ²⁾	0.840 \pm 0.136 ²⁾
空白组	6	0.285 \pm 0.081 ¹⁾	0.372 \pm 0.121 ¹⁾	0.203 \pm 0.092 ¹⁾	0.328 \pm 0.077 ¹⁾
生新组	6	0.465 \pm 0.103 ¹⁾²⁾	0.508 \pm 0.064 ²⁾	0.510 \pm 0.081 ¹⁾²⁾	0.514 \pm 0.076 ¹⁾²⁾
祛瘀组	6	0.463 \pm 0.089 ¹⁾²⁾	0.499 \pm 0.088 ²⁾	0.425 \pm 0.084 ¹⁾²⁾	0.523 \pm 0.132 ¹⁾²⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与空白组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

UC 一般从直肠发病, 向结肠蔓延, 最后炎症累及整个大肠^[9], 病程缠绵, 久治难愈, 且容易产生诸多并发症^[10], 甚至癌变可能^[11]。但是 UC 的发病机制仍不明确, 有研究认为可能与遗传、微生物、环境和免疫异常的相互作用致病^[12]。轻中度 UC

可予氨基水杨酸类、皮质固醇类治疗就能达到较好的效果, 但不良反应较多^[13]; 重度或激素抵抗 UC 只能应用于生物制剂甚至手术, 但价格太贵、损伤较大^[14]。中药对于 UC 的治疗历史悠久, 早在《黄帝内经》中就有“肠澼”“便脓血”的论述, 认为是阴阳失和、五脏脏气受损导致脾湿肝郁, 湿热内生腐

败肠络而致“下利脓血”^[15]。治法以健脾祛湿、活血化瘀及温补脾肾为原则^[16]。但 UC 病程很长, 中医有“久病必虚”“久病必瘀”理论^[17], 认为 UC 患者在湿热基础上多夹虚夹瘀。王教授以扶正祛瘀为治则治法创立了祛瘀生新方, 长期应用临床, 其有效率达 88%^[18]。方中黄芪健脾补中、托毒生肌, 鸡眼草(短穗铁苋菜)清热解毒、健脾利湿, 两者共为君药; 太子参、白术、地锦草、桃仁为臣, 能辅佐君药健脾补气, 燥湿泄浊; 而地锦草不仅能清热化湿, 解毒止痢, 还兼“善通流血脉”之功; 桃仁活血力强, 与黄芪、太子参等甘温之品同用, 能缓解其破血峻烈及润肠的药性, 不至于加重患者的便血和腹泻; 生地黄、川芎为使, 生地黄能清血中热而达到止血目的, 并能滋阴血以养脓血过多而伤血之证, 川芎散血中瘀血之郁结, 郁结得散, 血脉畅通, 溃疡才能愈合。该方诸药共用, 体现“补虚不碍邪、祛邪不伤正”的特点。但祛瘀生新方的作用机制仍不明确。

RIP1、RIP3 是受体作用相互蛋白家族成员, 在细胞程序性死亡及凋亡中起重要作用^[19]。RIP 家族通过参与坏死复合物的形成介导细胞坏死、触发炎症反应, 其中 RIP1 和 RIP3 与细胞坏死、炎症的关系尤为密切^[20]。有研究显示, 克罗恩病患者末期回肠中有较高水平的 RIP3 以及大量的回肠上皮细胞坏死^[21-22]。而且 UC 小鼠中 RIP1 也有明显升高^[23], 通过抑制 RIP1 及 RIP3 相关靶点可有效降低 NLRP3 的表达以治疗相关疾病的目的^[24-26]。

RIP3 能够与 MLKL、糖原磷酸化酶、谷氨酸氨连接酶以及谷氨酸脱氢酶 1 相互作用, 导致线粒体活性氧的产生, 而 ROS 会导致细胞膜内 K⁺ 外流, 同时诱导 NLRP3 炎性小体激活释放 caspase-1, caspase-1 会将 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 发展成成熟的 IL-1 β 、IL-18, 而 IL-1 β 、IL-18 能导致明显炎症反应^[27]。

我们的研究发现, DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜中 RIP1、RIP3 明显升高, 而 NLRP3、IL-1 β 蛋白及 mRNA 也明显升高。祛瘀生新方及美沙拉嗪治疗后 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β 蛋白及 mRNA 均有明显下降, 但祛瘀生新方与美沙拉嗪干预后 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β 蛋白及 mRNA 均无明显差别, 说明祛瘀生新方与美沙拉嗪在治疗 UC 小鼠效果相当。同时, 祛瘀生新方治疗的小鼠结肠明显长于对照组, 且体重也明显增加。祛瘀生新方拆方成祛瘀方和生新方, 祛瘀方以活血化瘀、清热利湿为功效, 生新方是以健脾补气、扶正生新为主要功效, 目的在于比较祛瘀生新方是健脾扶正还是祛瘀利湿在发挥主要作用。实验发现, 祛瘀方、生新方在降低 RIP1、RIP3、NLRP3、IL-1 β 蛋白及 mRNA 都有明显作用, 说明两者在治疗 UC 小鼠上都

有疗效。其中生新方较祛瘀方更能明显降低 IL-1 β mRNA 水平, 但在蛋白水平上两者无明显差异, 所以目前尚不能证明祛瘀生新方是哪部分药物在发挥作用, 或者说是祛瘀生新需要相互结合才能更好发挥作用。

然而也有研究显示, RIP1、RIP3 缺乏小鼠或人体会明显表现出免疫缺陷性疾病及肠道炎症症状, 甚至会诱发肠炎型肠癌^[28-29]。但 IBD 中 RIP1、RIP3 却表现为明显升高, 这可能表示 RIP1、RIP3 需要在组织中达到一定的平衡才能使组织细胞维持正常生物活性。

综上, 该研究显示祛瘀生新方可能是通过 RIP1/RIP3/NLRP3 信号通路达到治疗 UC 的作用, 而且短期内和美沙拉嗪疗效相当, 但长期作用效果是否与美沙拉嗪相当以及是否还对其他相关因子起作用, 还需要更深入的研究。

参考文献

- [1] Eisenstein M. Ulcerative colitis: towards remission [J]. *Nature*, 2018, 563(7730): S33.
- [2] Ng WK, Wong SH, Ng SC. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia [J]. *In-test Res*, 2016, 14(2): 111-119.
- [3] Zhen Y, Zhang H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 276.
- [4] Ranson N, Veldhuis M, Mitchell B, et al. NLRP3-Dependent and-Independent Processing of Interleukin (IL)-1 β in Active Ulcerative Colitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): 57.
- [5] 吴闯, 王芳. 从瘀虚论治溃疡性结肠炎 [J]. *山东中医杂志*, 2012, 31(10): 731-732.
- [6] Harris PA, Berger SB, Jeong JU, et al. Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) Kinase Specific Clinical Candidate (GSK2982772) for the Treatment of Inflammatory Diseases [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(4): 1247-1261.
- [7] Wu T, Dai Y, Xue L, et al. Expression of receptor interacting protein 3 and mixed lineage kinase domain-like protein-key proteins in necroptosis is upregulated in ulcerative colitis [J]. *Ann Palliat Med*, 2019, 8(4): 483-489.
- [8] 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.
- [9] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [10] Greuter T, Vavricka SR. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease-epidemiology, genetics, and pathogenesis [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 13(4): 307-317.
- [11] Yan P, Wang Y, Meng X, et al. Whole Exome Sequencing of Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancer

- Based on Novel Somatic Mutations Identified in Chinese Patients[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(8): 1293-1301.
- [12] Roberts-Thomson IC, Bryant RV, Costello SP. Uncovering the cause of ulcerative colitis[J]. *JGH Open*, 2019, 3(4): 274-276.
- [13] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [14] Bohl JL, Sobba K. Indications and Options for Surgery in Ulcerative Colitis[J]. *Surg Clin North Am*, 2015, 95(6): 1211-1132.
- [15] 吴佳, 李胜吾, 张镭潇, 等. 从《黄帝内经》辨析溃疡性结肠炎的病因病机及预后[J]. *山东中医杂志*, 2012, 31(5): 309-310.
- [16] 杨美霞, 郑红斌, 张心平, 等. 《黄帝内经》肠痹理论在溃疡性结肠炎诊治中的应用[J]. *浙江中医杂志*, 2020, 55(3): 167-168.
- [17] 叶天士. 临证指南医案[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 175-175.
- [18] 吴闯, 夏宇虹, 王芳, 等. 溃结 II 号方治疗溃疡性结肠炎 33 例[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2014, (4): 404-406.
- [19] Newton K, Manning G. Necroptosis and Inflammation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 743-763.
- [20] Newton K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(6): 347-353.
- [21] Negroni A, Colantoni E, Pierdomenico M, et al. RIP3 AND pMLKL promote necroptosis-induced inflammation and alter membrane permeability in intestinal epithelial cells[J]. *Dig Liver Dis*, 2017, 49(11): 1201-1210.
- [22] Degtarev A, Ofengeim D, Yuan J. Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(20): 9714-9722.
- [23] Guo Y, Wu X, Wu Q, et al. Dihydroanthranone I, a natural product, ameliorates DSS-induced experimental ulcerative colitis in mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 344: 35-45.
- [24] Lee SH, Kwon JY, Moon J, et al. Inhibition of RIPK3 Pathway Attenuates Intestinal Inflammation and Cell Death of Inflammatory Bowel Disease and Suppresses Necroptosis in Peripheral Mononuclear Cells of Ulcerative Colitis Patients[J]. *Immune Netw*, 2020, 20(2): e16.
- [25] 夏宏光, 吴劫, 段树民, 等. 新型 RIP1/RIP3 双靶点抑制剂及其在一药多靶疾病治疗中的用途: CN110759895A[P]. 2020-02-07.
- [26] Lee SH, Kwon JY, Moon J, et al. Inhibition of RIPK3 Pathway Attenuates Intestinal Inflammation and Cell Death of Inflammatory Bowel Disease and Suppresses Necroptosis in Peripheral Mononuclear Cells of Ulcerative Colitis Patients[J]. *Immune Netw*, 2020, 20(2): e16.
- [27] Wang X, Jiang W, Yan Y, et al. RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(12): 1126-1133.
- [28] Li Y, Führer M, Bahrami E, et al. Human RIPK1 deficiency causes combined immunodeficiency and inflammatory bowel diseases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(3): 970-975.
- [29] Liu ZY, Zheng M, Li YM, et al. RIP3 promotes colitis-associated colorectal cancer by controlling tumor cell proliferation and CXCL1-induced immune suppression[J]. *Theranostics*, 2019, 9(12): 3659-3673.

(收稿日期: 2020-08-11)