

## 基于TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路探讨黔产刺梨根干预溃疡性结肠炎的作用机制

陈波洋, 赵玲婕, 罗运凤, 管连城, 于海洋, 赵洁, 张旭飞, 蒋志滨, 陈云志

### Study on the Mechanism of Guizhou *Rosa roxburghii* Radix on Ulcerative Colitis Based on TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

CHEN Boyang, ZHAO Lingjie, LUO Yunfeng, GUAN Liancheng, YU Haiyang, ZHAO Jie, ZHANG Xufei, JIANG Zhibin, and CHEN Yunzhi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100024>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

#### 植物乳杆菌KLDS1.0386联合色氨酸对溃疡性结肠炎的影响

Effect of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0386 Combined with Degrading Tryptophan on Ulcerative Colitis

食品工业科技. 2020, 41(12): 296-301

#### 苦丁茶粗多酚对DSS诱导C57BL/6J小鼠溃疡性结肠炎的预防作用

Preventive effects of Kuding tea crude polyphenols in DSS-induced C57BL/6J mice ulcerative colitis

食品工业科技. 2017(09): 357-362

#### 正北芪多糖对结肠炎小鼠的抗炎作用研究

Anti-inflammatory Effect of Astragali Radix Polysaccharide on Mice with Ulcerative Colitis

食品工业科技. 2021, 42(16): 325-330

#### 鱼腥草多糖对DSS诱导小鼠结肠炎的改善作用

Improving Effect of *Houttuynia Cordata* Polysaccharide on Dextran Sodium Sulfate-induced Ulcerative Colitis

食品工业科技. 2021, 42(23): 362-369

#### 枸杞多糖对LPS诱导BV2小胶质细胞的抗炎活性及NF- $\kappa$ B信号通路的调控作用

Effects of *Lycium barbarum* Polysaccharides on Anti-inflammatory Activity and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Induced by LPS in BV2 Microglia

食品工业科技. 2021, 42(3): 304-309,319

#### 小蓬草乙醇提取物对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠的抗炎作用

Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extract from *Conyza canadensis* on DSS-induced Ulcerative Colitis in Mice Model

食品工业科技. 2021, 42(15): 314-320



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

陈波洋, 赵玲婕, 罗运凤, 等. 基于 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨黔产刺梨根干预溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 353–358. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100024

CHEN Boyang, ZHAO Lingjie, LUO Yunfeng, et al. Study on the Mechanism of Guizhou *Rosa roxburghii* Radix on Ulcerative Colitis Based on TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 353–358. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100024

· 营养与保健 ·

# 基于 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨黔产刺梨根 干预溃疡性结肠炎的作用机制

陈波洋<sup>1</sup>, 赵玲婕<sup>1</sup>, 罗运凤<sup>2</sup>, 管连城<sup>3</sup>, 于海洋<sup>1</sup>, 赵 洁<sup>1</sup>, 张旭飞<sup>1</sup>, 蒋志滨<sup>1</sup>, 陈云志<sup>1,\*</sup>

(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵州贵阳 550025;

2. 黔南州中医院, 贵州都匀 558000;

3. 贵州中医药大学附属第二医院, 贵州贵阳 550001)

**摘要:**目的: 基于 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨黔产刺梨根治疗溃疡性结肠炎大鼠的作用机制。方法: 采用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) /乙醇溶液灌肠建立溃疡性结肠炎模型, 灌胃刺梨根水煎液高、中、低剂量组 (8、4、2 g/kg), 柳氮磺吡啶组 (0.3 g/kg)。观察大鼠外观、动作行为以及血便; 采集大鼠血清与大鼠结肠, 利用苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组大鼠结肠病理学改变; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测大鼠血清白细胞介素 (IL) -1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平; 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测大鼠结肠 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 mRNA 表达; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠结肠 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 蛋白表达。结果: 刺梨根水煎液可明显改善溃疡性结肠炎大鼠结肠炎症损伤, 特别是刺梨根水煎液高剂量组。与模型组比较, 刺梨根水煎液高剂量组结肠病理损伤得到显著改善, 刺梨根水煎液高剂量组血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平均极显著下降 ( $P < 0.01$ ); 结肠 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、TLR4 mRNA 表达量显著下降 ( $P < 0.05$ ); 结肠 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 蛋白表达量极显著下降 ( $P < 0.01$ )。结论: 刺梨根水煎液可有效缓解 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎并改善炎症损伤, 刺梨根水煎液干预溃疡性结肠炎的作用机制可能与抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关。

**关键词:** 刺梨根, 溃疡性结肠炎, TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号: TS201.4; R574.62

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)13-0353-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100024



本文网刊:

## Study on the Mechanism of Guizhou *Rosa roxburghii* Radix on Ulcerative Colitis Based on TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

CHEN Boyang<sup>1</sup>, ZHAO Lingjie<sup>1</sup>, LUO Yunfeng<sup>2</sup>, GUAN Liancheng<sup>3</sup>, YU Haiyang<sup>1</sup>, ZHAO Jie<sup>1</sup>,  
ZHANG Xufei<sup>1</sup>, JIANG Zhibin<sup>1</sup>, CHEN Yunzhi<sup>1,\*</sup>

(1. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

2. Qiannan Traditional Chinese Medicine Hospital, Duyun 558000, China;

3. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

**Abstract:** Objective: To explore the mechanism of Guizhou *Rosa roxburghii* Radix in the treatment of ulcerative colitis in rats based on TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. Methods: The ulcerative colitis model was established by gavage with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)/ethanol solution, gavage with *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction high, medium and low dose groups (8, 4 and 2 g/kg) and salazosulfanil group (0.3 g/kg). Observation of the appearance, motor behaviour and blood stool of the rats. Serum and colon of rats were collected, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used to

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1712500); 贵州省一流学科建设项目 (QYNYL[2017]005); 2021 贵州中医药大学科研创新和探索专项项目 (2019YFC171250101)。

作者简介: 陈波洋 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医证候物质基础; E-mail: 1519477072@qq.com。

\* 通信作者: 陈云志 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医证候物质基础研究, E-mail: chenyunzhi270@gzy.edu.cn。

observe the pathological changes in the colon of each group of rats. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of serum interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  levels in rats. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of rat colon Myd88, NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65, TLR4 mRNA expression. Protein immunoblotting (Western blot) was performed to detect Myd88, NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65, TLR4 protein expression in rat colon. Results: *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction significantly improved colonic inflammatory injury in rats with ulcerative colitis, especially in the high dose group of *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction. Compared with the model group, the *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction high-dose group showed significant improvement in colon pathological damage. Serum IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels were significantly decreased in the *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction high-dose group ( $P < 0.01$ ); colon Myd88, NF- $\kappa$ B p50, TLR4 mRNA expression was significantly decreased ( $P < 0.05$ ); colon Myd88, NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65, TLR4 protein expression was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Conclusion: *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction can effectively alleviate TNBS-induced ulcerative colitis and ameliorate inflammatory damage. The mechanism of action of *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction intervention in ulcerative colitis may be related to the inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** *Rosa roxburghii* Radix; ulcerative colitis; TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种反复发作的特发性慢性结肠黏膜炎疾病, 以血性腹泻、腹痛等为典型临床症状<sup>[1]</sup>。近年来, UC 发病率明显上升且发病人群呈年轻化, 已成为一种全球性疾病<sup>[2]</sup>。UC 病因病机复杂, 受遗传、环境、心理健康、免疫等因素的共同影响<sup>[3]</sup>, 而免疫功能在其中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。目前, 常用 5-氨基水杨酸、糖皮质激素、硫嘌呤等作为 UC 的治疗药物, 但作用效果有限且副作用多<sup>[5]</sup>。溃疡性结肠炎与 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路关系密切<sup>[6]</sup>。TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路是 UC 发病过程中的重要介导因子, 常导致 UC 患者结肠炎症持续性加重, 已成为 UC 患者药物治疗的靶点之一<sup>[7]</sup>。

刺梨深受贵州人民喜爱, 并且与刺梨相关的产品也已遍布全国。刺梨根始载于《草木便方》, 系蔷薇科植物缙丝花 *Rosa roxburghii* Tratt 的根, 具有健胃消食, 止泻涩精的功效。现代药理研究表明, 刺梨根茎中的三萜类、鞣花酸类、黄酮类以及寡糖类化合物是其抗炎作用的主要有效成分, 并且实验验证了刺梨根茎的民间抗炎功效<sup>[8]</sup>。临床常用于治疗痢疾、泄泻等消化系统疾病。研究发现, 刺梨根水煎液可促进大鼠胃溃疡愈合<sup>[9]</sup>。此外, 临床上用鲜刺梨根水煎液治疗急性细菌性痢疾有较好疗效, 总有效率达 92.3% 且无不良反应<sup>[10]</sup>。

故本课题组从 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨黔产刺梨根干预溃疡性结肠炎大鼠的作用机制, 以期刺梨根的临床应用提供一定的理论依据, 更为了刺梨根在现实生活中应用的普及, 使刺梨根这种价廉物美的天然营养植物对人类的健康作出重要贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只 体质量(230 $\pm$ 10)g, 天勤生物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK(湘) 2019-0014, 本次动物实验获得贵州中医药大学伦理委员会批准。大鼠在温度 22~24  $^{\circ}$ C、相对湿度 40%~60% 下用普通饲料喂养 7 d 后开始实验; 黔产刺梨根 贵州中医药大学附属第二医院, 经贵州中医药大学

方药教研室蒋志滨副教授鉴定为蔷薇科植物缙丝花 *Rosa roxburghii* Tratt 的根; 柳氮磺嘧啶 (批号: E1525058) Aladdin 公司; 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS, 批号: SLBX3263) Sigma 公司; 白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒 (批号分别为: JYM0419Ra、JYM0646Ra、JYM0635Ra) 基因美生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒 (批号: BM1144) 博美生物科技有限公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (批号: RR047A) 宝日生物技术有限公司; 预染蛋白 Marker (批号: RM19001) ABCclone 公司; ECL 发光试剂盒 (批号: KF001) Affinity 公司; Immobilon-PSQ PVDF 膜 (批号: ISEQ00010) Sigmaaldrich 公司; Glycine、Tris for molecular biology、SDS (批号分别为: 1275GR500、1115GR500、1275GR500) Biofroxx 公司; 兔多抗 SLC6A4 (批号分别为: YO7512, G1005-1, G1001, A14782) ABclonal 公司。

QuantStudio <sup>TM</sup>3 实时荧光定量 (RT-PCR) 仪、TCA0096 热循环仪、MK3 多功能酶标仪 Thermo Fisher 仪器有限公司; KZ-III-F 高速低温组织研磨仪 赛维尔生物科技有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 药物制备 刺梨根经蒸馏水浸泡 20 min 后, 武火煮沸 30 min 及文火煎煮 1 h, 再重复以上操作一次, 合并两次煎煮液, 生药质量浓度为 8 g/mL, 放置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.2 动物模型制作 将 60 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组 (10 只)、模型组 (50 只)。据参考文献 [11] 并结合预实验结果, 造模前大鼠禁食 24 h, 确定大鼠直肠内排空大便。乙醚麻醉后使用生理盐水润滑聚乙烯管, 将 TNBS 与乙醇混合溶液 (100 mg/kg TNBS+0.25 mL 50% 乙醇) 缓慢注入距大鼠肛门处约 8 cm 的结肠部位, 灌肠 1 次。灌肠结束后, 将大鼠头部朝下倒置约 5 min, 并用小夹子夹住肛周皮肤, 谨防 TNBS 药物流出, 直至大鼠苏醒。空白组大鼠结肠灌注 0.8 mL 生理盐水。以体重明显下降, 出现典型腹



泻、粪便中有暗红色斑点且肛门可见出血作为模型制备成功的标准。

**1.2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠结肠组织病理变化** 随机抽取 2 只大鼠,采取 HE 染色观察各组大鼠结肠组织的病理学改变。研究表明,结肠病理显示充血、水肿、大肠黏膜固有层淋巴细胞浸润,中性粒细胞增多,腺体病变及溃疡形成等系列变化,提示 UC 造模成功<sup>[12]</sup>。

**1.2.4 动物分组、给药与取样** 造模成功后,取空白组中 8 只正常大鼠为正常组,再将 40 只造模成功大鼠随机分为 5 组:UC 模型组、柳氮磺嘧啶组、刺梨根水煎液高、中、低剂量组。柳氮磺嘧啶组 0.3 g/(kg·d)灌胃,刺梨根水煎液高、中、低组分别按 8、4、2 g/(kg·d)剂量灌胃(给药剂量按 60 kg 成人临床常用剂量与大鼠体表面积折算),正常组、UC 模型组均灌胃等体积生理盐水,1 次/日,连续给药 21 d。第 21 d 末时禁食 24 h,大鼠腹腔注射 350 mg/kg 水合氯醛麻醉,并腹主动脉取血,静置 30 min,低温离心 10 min (3000 r/min),分离收集血清,-80 °C 低温冰箱保存。取血完毕后快速收集结肠组织,截取结肠远端部分并纵行剖开后用冰生理盐水冲洗肠道内容物。使用滤纸吸收多余水分,纵行一分为二,一部分用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片、HE 染色,显微镜下观察结肠组织形态。一部分-80 °C 低温冰箱保存,用于检测结肠中 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 mRNA 及蛋白表达。

**1.2.5 ELISA 检测大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平** 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作与检测,使用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 A,并根据标准曲线获得样品检测目标的浓度。

**1.2.6 荧光定量 PCR 法检测结肠 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 mRNA 表达** 根据说明书,先提取样品总 RNA,再反转录合成 cDNA。引物由上海生工生物工程技术有限公司设计合成,并以 ULTRAPAGE 纯化,见表 1。使用 Thermo Scientific PikoReal 软件分析 PCR 过程各样本的 CT (Threshold cycle)值。反应结束后作熔解曲线检测扩增产物的纯度。通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 mRNA 的相对表达量。

表 1 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 mRNA 引物序列及片段长度

Table 1 Myd88, NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65, TLR4 mRNA primer sequences and fragment lengths

引物名称	上游	下游
Myd88	cgcctctcgtgttctgaacc	gatctccaagtactcgaaccatctc
NF- $\kappa$ B p50	ggtgctccactgagaagaacaag	gtgaccaactgaacgataacctttgc
NF- $\kappa$ B p65	gtcaccactgttgcacccttg	gcttcagcttgaaaaggcatcttc
TLR4	cattgtctcttccctgctgagacc	tgagattctgatcatcattggttagg
$\beta$ -actin	gaagatcaagatcattgctcc	tactctgctgctgatcca

**1.2.7 Western blot 检测结肠 Myd88、NF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、TLR4 蛋白表达** 参照说明书,将样本取出放入 2 mL 研磨管中,然后向每管加入 3 mm 钢珠及 RIPA 裂解液(按照质量比样本:裂解液=1:10),置于高速低温组织研磨仪内(温度-20 °C,研磨 4 次,每次 60 s);取出放 4 °C 冰箱 30 min 进行裂解,30 min 后取出放入离心机(4 °C、12000 r/min 离心、10 min);用 BCA 蛋白定量试剂盒测定离心完毕后上清液的蛋白浓度。配置相应电泳凝胶,上样后进行电泳、转膜,用 TBST 封闭 2 h,将 PVDF 膜放入一抗中,(一抗浓度:Myd88 1:1000;p50 1:1000;p65 1:2000;TLR4 1:1000; $\beta$ -actin 1:100000),摇床上轻摇,4 °C 孵育过夜;用 TBST 将 PVDF 膜洗 3 次,每次 5 min;在二抗中放入 PVDF 膜(稀释浓度:1:5000)中,摇床上轻摇,室温孵育 2~3 h;用 TBST 将 PVDF 膜洗 3 次,每次 10 min,将 ECL 发光液的 A、B 两种试剂等体积混匀后滴加至平铺到曝光板的 PVDF 膜上,反应 1 min 后,将装有 PVDF 膜的曝光板放入化学发光凝胶成像仪的暗室中,依据信号强弱合适调整曝光时间,曝光。最后用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 曝光扫描条带,结果以目的蛋白相对表达量表示。

### 1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 统计软件和 Graph Pad Prism 8.0.1 作图软件进行数据分析及处理,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组样本均值采用单因素方差分析 (ANOVA),两两比较采用 LSD 检验及 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$  表明结果差异具有统计学意义, $P < 0.01$  表明统计结果具有极显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 一般状态观察

各组大鼠饲喂 21 d,取材前一天。正常组大鼠精力旺盛,活动性高,毛发柔顺有光泽,大便正常。模型组大鼠出现懒动,喜蜷伏角落扎堆,毛悴色夭,体质量下降,大便稀溏或半稀溏,伴有脓血,拖尾。刺梨根水煎液低剂量组大鼠与模型组大鼠外观、行为、精神等基本一致或看不出改善;刺梨根水煎液中剂量组大鼠外观、行为、精神等稍有改善;刺梨根水煎液高剂量组与柳氮磺嘧啶组大鼠活动趋于正常,毛发逐渐恢复至相对有光泽,大便逐渐成形,与正常组接近。

### 2.2 UC 大鼠结肠组织病理变化的影响

正常组结肠黏膜各组织结构较完整,固有层内大肠腺排列较为密集且大小相近,未见上皮细胞变性坏死或脱落。与正常组相比,模型组结肠黏膜完整性受到破坏,固有层内部肠腺腺腔膨胀,黏膜下层或结肠全层形成明显溃疡,出现大量炎性细胞、坏死组织取代正常结构。刺梨根水煎液低剂量组结肠黏膜等较模型组基本一致或改善不明显;刺梨根水煎液中剂量组结肠黏膜破坏稍有改善,但尚存在炎性细胞与坏死组织等;刺梨根水煎液高剂量组与柳氮磺嘧啶组两组较模型组比,大鼠结肠黏膜各组织结构较为清晰,

肠腺排列相对规则, 间质内偶见单个淋巴细胞或中性粒细胞。见图 1。

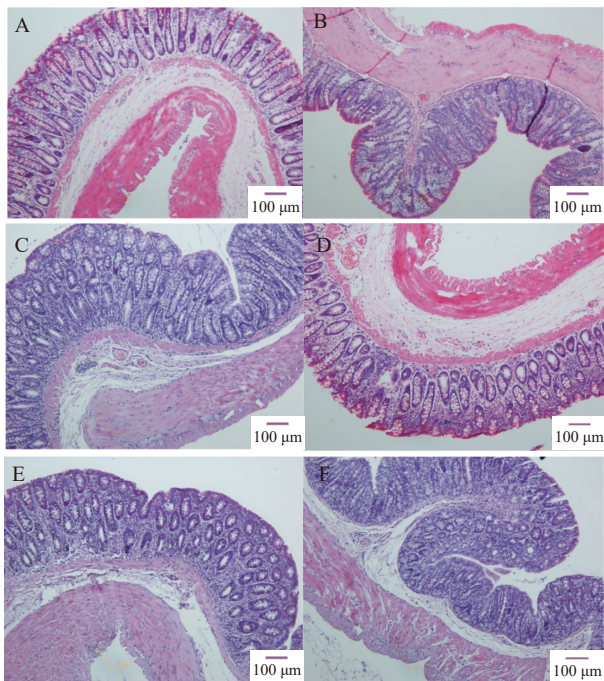


图 1 刺梨根水煎液对 UC 大鼠结肠组织的影响(HE, 100×)  
Fig.1 Effect of *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction on the colonic tissue of UC rats (HE, 100×)

注: A: 正常组; B: 模型组; C: 柳氮磺吡啶组; D: 刺梨根水煎液高剂量组; E: 刺梨根水煎液中剂量组; F: 刺梨根水煎液低剂量组; 图 2、图 4 同。

### 2.3 刺梨根水煎液对 UC 大鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平影响

模型组较正常组而言, 大鼠结肠中 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达极显著升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。刺梨根水煎液高剂量组干预后可明显抑制各炎症因子的分泌; 刺梨根水煎液高、中剂量组较模型组比, 均可显著降低 IL-1β、IL-6 与 TNF-α 表达水平 ( $P < 0.05$ )。刺梨根水煎液高剂量组与柳氮磺吡啶组抑制 IL-1β、IL-6、TNF-α 的效果相比, 差异不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 刺梨根水煎液中、低剂量组与柳氮磺吡啶组抑制 IL-1β、IL-6、TNF-α 的效果相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

### 2.4 刺梨根水煎液对 UC 模型大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 mRNA 表达的影响

模型组较正常组比, 大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50 mRNA 表达极显著上升 ( $P < 0.01$ ), TLR4 mRNA 表达显著上升 ( $P < 0.05$ )。刺梨根水煎液高剂量组较模型组比, 大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50、TLR4 mRNA 表达均显著下降 ( $P < 0.05$ ); 刺梨根水煎液中剂量组较模型组相比, 大鼠结肠 Myd88 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 刺梨根水煎液低剂量组较模型组相比, 大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 mRNA 表达无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。刺梨根水煎液高、中剂量组较柳氮磺吡啶组相比, 大鼠结肠

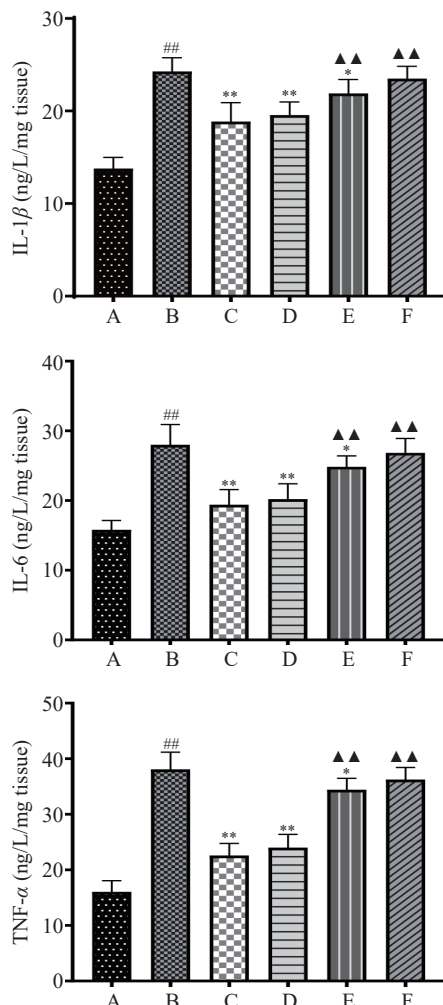


图 2 刺梨根水煎液对 UC 大鼠结肠组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig.2 Effect of *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction on the expression levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in the colonic tissues of UC rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

注: 与正常组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与模型组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与柳氮磺吡啶组相比, ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$ , 图 3-图 4 同。

Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 mRNA 表达无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 刺梨根水煎液低剂量组较柳氮磺吡啶组相比, 大鼠结肠 Myd88、TLR4 mRNA 表达显著上升 ( $P < 0.05$ ), NF-κB p50 mRNA 表达极显著升高 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 3。

### 2.5 刺梨根水煎液对 UC 模型大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 蛋白表达的影响

模型组较正常组比, 大鼠结肠 Myd88 蛋白表达显著上升 ( $P < 0.05$ ), NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 蛋白表达水平均极显著升高 ( $P < 0.01$ )。刺梨根水煎液高剂量组较模型组比, 大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 蛋白表达均极显著降低 ( $P < 0.01$ ); 刺梨根水煎液中剂量组较模型组比, 大鼠结肠 Myd88 蛋白表达极显著下降 ( $P < 0.01$ ), NF-κB p65、TLR4 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 刺梨根水煎液低剂量组较模型组比, 各蛋白表达不具备统计学差异 ( $P > 0.05$ )。刺梨根水煎液高剂量组较柳氮磺吡啶



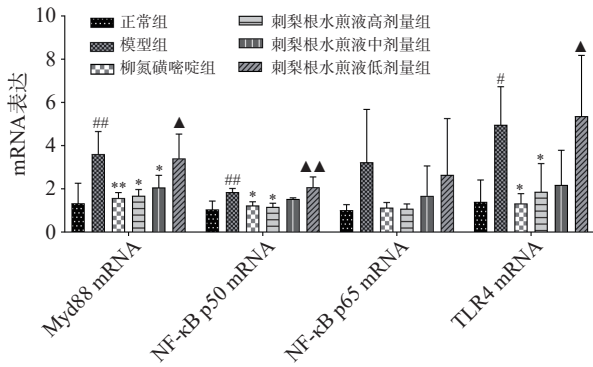


图 3 刺梨根水煎液对 UC 模型大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig.3 Effect of *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction on the expression of Myd88, NF-κB p50, NF-κB p65 and TLR4 mRNA in the colon of UC model rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组比, 各组蛋白不具备统计学差异( $P>0.05$ ); 刺梨根水煎液中剂量组较柳氮磺嘧啶组比, NF-κB p65 蛋白表达显著上升( $P<0.05$ ); 刺梨根水煎液低剂量组较柳氮磺嘧啶组比, NF-κB p65、TLR4 蛋白表达极显著升高( $P<0.01$ ), 结果见图 4。

### 3 讨论

UC 是一种以肠道炎症与结肠粘膜损害为特征的常见消化系统疾病。TLR4/NF-κB 信号通路在 UC 的发病机制中发挥关键作用<sup>[7]</sup>。研究表明, UC 的炎症机制被 NF-κB 激活后导致肠道炎性因子异常表达<sup>[13]</sup>。从而激活 UC 一系列免疫、炎症反应, 加速 UC 的发生发展<sup>[14]</sup>。因此, 抑制 NF-κB 激活作为有效的治疗策略可减轻 UC 患者的不良反应<sup>[15]</sup>。

Toll 样受体(TLRs)作为模式识别受体家族的主要类型之一, 主要诱导炎症发生和建立适应性免疫<sup>[16]</sup>。其中, 亚型 TLR4 识别病原体相关分子模式(PAMPs)被激活后, 招募骨髓样分化蛋白(MyD88)

触发信号级联诱导 NF-κB 激活<sup>[17]</sup>。进而促进 NF-κB p50 与 NF-κB p65 从细胞质易位至细胞核与 DNA 结合<sup>[4,18]</sup>。随后在结肠组织及外周血中释放大量的 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症介质, 加剧 UC 患者结肠及外周血的炎症浸润<sup>[19-20]</sup>。

本研究选用刺梨根作为实验材料, 建立 UC 大鼠模型, 通过 PCR、Western blot、ELISA 法及结肠组织病理切片等分析刺梨根水煎液对 UC 的干预作用。结果表明, 造模成功后, 模型组大鼠结肠及血清中各个检测指标与正常组差异显著( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。与模型组相比, 刺梨根水煎液高剂量组大鼠结肠组织中 Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65 及 TLR4 mRNA 蛋白表达显著降低( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ); 说明刺梨根水煎液抑制了炎症发生机制的相关基因及蛋白表达, 有效阻止或平衡了 UC 炎症通路的激活; 同时, 刺梨根水煎液高剂量组大鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 炎症因子表达较模型组极显著下降( $P<0.01$ ), 表明刺梨根水煎液可改善 UC 结肠组织中炎症因子水平, 能够有效缓解 UC 中的炎症浸润, 促使 UC 大鼠病变结肠康复。观察结肠组织病理切片, 刺梨根水煎液高剂量组可明显改善病变结肠受损情况。

### 4 结论

综上, 本研究发现刺梨根水煎液高剂量组可明显改善 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎病理损伤, 发挥保护肠道的的作用。其作用机制与 TLR4/NF-κB 信号通路密切相关, 刺梨根水煎液高剂量组使这条通路向正常状态明显转变, 发挥抗炎作用, 减轻 UC 大鼠肠道内炎症侵袭。本文初步阐明刺梨根水煎液对 UC 大鼠抗炎的作用机制, 一方面可为临床刺梨根治疗溃疡性结肠炎提供理论依据与实验基础; 另一方面可通过刺梨根抗肠炎普及刺梨根这种价廉物美的天然营养植物, 使其成为人类健康的福祉。

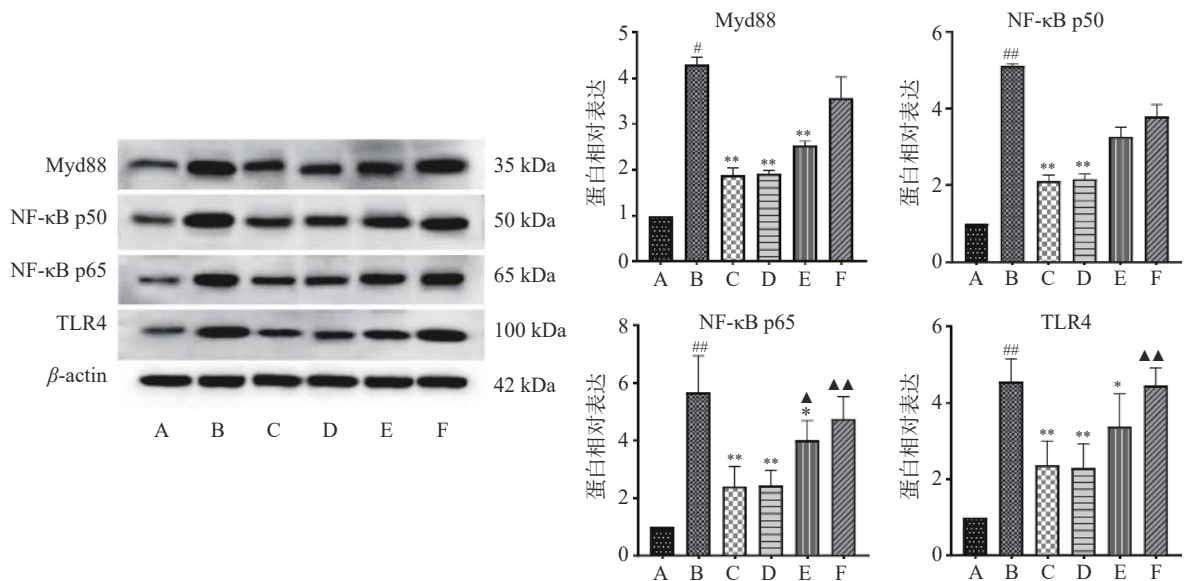


图 4 刺梨根水煎液对 UC 模型大鼠结肠 Myd88、NF-κB p50、NF-κB p65、TLR4 蛋白相对表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig.4 Effect of *Rosa roxburghii* Radix aqueous decoction on the relative expression of Myd88, NF-κB p50, NF-κB p65 and TLR4 proteins in the colon of UC model rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

## 参考文献

- [ 1 ] ORDÁS I, ECKMANN L, TALAMINI M, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606–1619.
- [ 2 ] MAK W Y, ZHAO M, NG S C, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 35(3): 380–389.
- [ 3 ] EISENSTEIN M. Ulcerative colitis: Towards remission[J]. *Nature*, 2018, 563(7730): S33.
- [ 4 ] DE SOUZA H S, FIOCCHI C. Immunopathogenesis of IBD: Current state of the art[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(1): 13–27.
- [ 5 ] CROWELL K T, MESSARIS E. Ulcerative colitis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 27.
- [ 6 ] ZHOU M, XU W, WANG J, et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- $\kappa$ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury[J]. *EBio Medicine*, 2018, 35: 345–360.
- [ 7 ] KE X, ZHOU F, GAO Y, et al. Qing Hua Chang Yin exerts therapeutic effects against ulcerative colitis through the inhibition of the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 926–930.
- [ 8 ] 梁勇, 李良群, 王丽, 等. 民族药刺梨根茎化学成分及其抗炎活性研究 [J/OL]. 广西植物: 1–12 [2021-12-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20210929.1821.007.html>. [ LIANG Yong, LI Liangqun, WANG Li, et al. Chemical constituents and their anti-inflammatory activities from rhizome of ethnic medicine *Rosa roxbunghii*[J]. *Guihaia*: 1–12 [2021-12-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20210929.1821.007.html>. ]
- [ 9 ] 陈建中, 蒙启飞, 陈建华, 等. 刺梨根煎液防治慢性胃溃疡的实验研究 [J]. *贵州医药*, 2001, 25(7): 584–585. [ CHEN Jianzhong, MENG Qifei, CHEN Jianhua, et al. The experiment study of chronic gastric ulcer treatment with root of *Rosa roxbunghii* Tratt in rats[J]. *Guizhou Medical Journal*, 2001, 25(7): 584–585. ]
- [ 10 ] 陈云志, 刘安英. 鲜刺梨根煎剂治疗急性细菌性痢疾 52 例 [J]. *新中医*, 2007, 39(7): 70. [ CHEN Yunzhi, LIU Anying. 52 cases of acute bacterial dysentery treated with fresh ethnic medicine *Rosa roxbunghii* decoction[J]. *Journal of New Chinese Medicine*, 2007, 39(7): 70. ]
- [ 11 ] 杨显娟, 付尹, 王佳俊, 等. 黄连-厚朴配伍抑制 PI3K/Akt 信号通路改善 TNBS 诱导的大鼠溃疡性结肠炎研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(15): 4587–4597. [ YANG Xianjuan, FU Yin, WANG Jiajun, et al. Effect of coptidis rhizoma-magnoliae officinalis cortex on TNBS-induced ulcerative colitis in rats by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(15): 4587–4597. ]
- [ 12 ] 吴东升, 曹晖, 张彧, 等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜免疫屏障的干预作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 25(9): 6–11. [ WU Dongsheng, CAO Hui, ZHANG Yu, et al. Intervention effect of Shaoyao Tang on intestinal mucosal immune barrier in rats with ulcerative colitis[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2018, 25(9): 6–11. ]
- [ 13 ] SUN L D, WANG F, DAI F, et al. Development and mechanism investigation of a new piperlongumine derivative as a potent anti-inflammatory agent[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 95(3): 156–169.
- [ 14 ] KUZMICH N N, SIVAK K V, CHUBAREV V N, et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis[J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(4): 34.
- [ 15 ] ATREYA I, ATREYA R, NEURATH M F. NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease[J]. *J Intern Med*, 2008, 263(6): 591–596.
- [ 16 ] KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptor function and signaling[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(5): 979–987.
- [ 17 ] CHAMANARA M, RASHIDIAN A, MEHR S E, et al. Melatonin ameliorates TNBS-induced colitis in rats through the melatonin receptors: Involvement of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signalling pathway[J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(2): 361–371.
- [ 18 ] ZHAO R, YING M, GU S, et al. Cysteinyl leukotriene receptor 2 is involved in inflammation and neuronal damage by mediating microglia M1/M2 polarization through NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Neuroscience*, 2019, 422: 99–118.
- [ 19 ] MIYAKE K. Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotoxin shock[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2004, 3(3): 291–297.
- [ 20 ] INDARAM A V, VISVALINGAM V, LOCKE M, et al. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease[J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(5): 1221–1225.