

引用:邱爱珠,徐晔青,欧阳翌国,李媛彬,王紫薇.基于TLR4/NF-κB/NLRP3通路探讨荆芥连翘汤对溃疡性结肠炎(大肠湿热证)大鼠的作用及机制[J].中医药导报,2025,31(12):54-60.

基于TLR4/NF-κB/NLRP3通路探讨 荆芥连翘汤对溃疡性结肠炎(大肠湿热证) 大鼠的作用及机制*

邱爱珠¹,徐晔青²,欧阳翌国¹,李媛彬¹,王紫薇¹

(1.湖南中医药高等专科学校医学院,湖南 株洲 412000;
2.株洲市中心医院,湖南 株洲 412000)

[摘要] 目的:观察荆芥连翘汤对溃疡性结肠炎(大肠湿热证)模型大鼠的影响,并基于TLR4/NF-κB/NLRP3信号通路探讨其作用机制。方法:将55只SPF级SD大鼠随机分为5组:正常组、模型组、西药组、灌胃组及灌肠组,每组11只。除正常组外,其余各组建立溃疡性结肠炎(大肠湿热证)大鼠模型。造模成功后,西药组采用美沙拉嗪[0.42 g/(kg·d)]进行灌胃,1次/d;灌胃组、灌肠组分别采用荆芥连翘汤[38.84 g/(kg·d)]进行灌胃、灌肠;正常组、模型组给予0.9%氯化钠注射液灌胃。以上处理持续2周。其间观察大鼠一般行为变化并进行疾病活动指数(DAI)评分。实验结束后,使用HE染色法观察大鼠结肠组织病理变化,免疫组化检测大鼠结肠组织中TLR4、NF-κB、NLRP3、ASC、pro-IL-1β、Caspase-1的蛋白表达情况,实时荧光定量-聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测TLR4 mRNA表达情况,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测大鼠血清炎症因子(IL-1β、TNF-α)和抑炎因子(IL-10)的表达情况。结果:与正常组比较,模型组小鼠疾病活动指数DAI评分、血清IL-1β、TNF-α均增加($P<0.05$),IL-10下降($P<0.05$),结肠组织出现明显的病理学改变,其炎症因子表达含量升高,结肠中TLR4 mRNA及TLR4、NF-κB、NLRP3、Caspase-1、ASC、pro-IL-1β等蛋白表达显著上调($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠DAI评分、血清炎症因子IL-1β、TNF-α表达均降低,IL-10升高($P<0.05$),结肠中TLR4 mRNA及TLR4、NF-κB、NLRP3、Caspase-1、ASC、pro-IL-1β等蛋白表达显著下调($P<0.05$)。与西药组比较,灌胃组大鼠IL-10升高、TLR4 mRNA表达下降、IL-1β降低($P<0.05$),其余指标则差异无统计学意义($P>0.05$)。灌肠组在降低炎症因子IL-1β、抑制TLR4 mRNA表达方面优于灌胃组($P<0.05$)。结论:荆芥连翘汤可抑制TLR4/NF-κB/NLRP3通路激活,降低炎症反应,改善UC(大肠湿热症)大鼠症状和肠黏膜损伤,且灌肠给药相比灌胃给药具有一定优势。

[关键词] 溃疡性结肠炎;大肠湿热证;荆芥连翘汤;SD大鼠;灌胃;灌肠;TLR4/NF-κB;NLRP3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)12-0054-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.009

Effect and Mechanism of Jingjie Lianqiao Decoction (荆芥连翘汤) on Ulcerative Colitis (Damp-Heat Syndrome of Large Intestine) Based on TLR4/NF-κB/NLRP3 Pathway

QIU Aizhu¹, XU Yeqing², OUYANG Yiguo¹, LI Yuanbin¹, WANG Ziwei¹

(1.School of Medicine, Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou Hunan 412000, China;

2.Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou Hunan 412000, China)

[Abstract] Objective: To observe the effects of Jingjie Lianqiao decoction on ulcerative colitis (damp-heat syndrome of large intestine) model rats and to explore its mechanism of action based on the toll-like receptor 4 (TLR4)/ nuclear factor kappa B (NF-κB)/nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3) signaling pathway. Methods: Totally 55 SPF-grade SD rats were randomly divided into five groups, including normal group, model group, Western medicine group, gastric administration group, and enema

*基金项目:湖南省中医药管理局科研课题(2021099)

group, with 11 rats in each group. Except for the normal group, the other groups established ulcerative colitis (damp-heat syndrome of large intestine) rat models. After successful modeling, the Western medicine group received meclizine at a dose of 0.42 g/(kg·d) via gastric administration once daily. The gastric administration group and enema group received Jingjie Lianqiao decoction at a dose of 38.84 g/(kg·d) via gastric and enema administration, respectively. The normal group and model group received physiological saline via gastric administration. All treatments were conducted for two weeks. During this period, general behavioral changes of the rats were observed, and disease activity index (DAI) scores were recorded. At the end of the experiment, colon and serum samples were collected, and HE staining was used to observe histopathological changes in the colon tissue. Immunohistochemistry was performed to detect protein expression levels of TLR4, NF-κB, NLRP3, ASC, pro-IL-1β, and Caspase-1 in the colon tissue. qRT-PCR was used to detect TLR4 mRNA expression. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was employed to detect the expression levels of inflammatory factors (IL-1β, TNF-α) and anti-inflammatory factors (IL-10) in the mouse blood. Results: Compared to the normal group, the disease activity index DAI score, and serum inflammatory factors (IL-1β and TNF-α) in the model group mice were significantly increased ($P<0.05$), while IL-10 was significantly decreased ($P<0.05$). There were significant pathological changes in the colon tissue, with elevated expression of inflammatory factors in model group. The expression levels of TLR4 mRNA, TLR4, NF-κB, NLRP3, Caspase-1, ASC, and pro-IL-1β in the colon were significantly upregulated in model group ($P<0.05$). Compared to the model group, the DAI scores and serum inflammatory factor (IL-1β and TNF-α) expression in all drug-administered groups were significantly reduced, while IL-10 was significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of TLR4 mRNA, TLR4, NF-κB, NLRP3, Caspase-1, ASC, and pro-IL-1β in the colon were significantly downregulated in all drug-administered groups ($P<0.05$). Compared with the Western medicine group, the gavage group showed increased IL-10, decreased TLR4 mRNA expression, and reduced IL-1β ($P<0.05$), while the remaining indicators showed no statistically significant differences ($P>0.05$). The enema group performed better than the gavage group in reducing inflammatory factors IL-1β, and inhibiting TLR4 mRNA expression ($P<0.05$). Conclusion: Jingjie Lianqiao decoction can inhibit the activation of TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway, reduce inflammatory response, improve symptoms and intestinal mucosal damage in UC (damp-heat syndrome of alarge intestine) model rats, and enema administration has certain advantages compared with gastric administration.

[Keywords] ulcerative colitis; damp-heat syndrome of large intestine; Jingjie Lianqiao decoction; SD rats; gavage; enema; TLR4/NF-κB; NLRP3

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是一种病因尚不清楚的慢性非特异性肠道炎症性疾病^[1],是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的主要临床亚型,其主要临床表现为持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便,可伴腹痛、里急后重及不同程度的发热、食欲减退、乏力等全身症状^[2],病变可累及直肠、结肠的不同部位,是消化系统疑难病之一。该病多反复发作,迁延难愈。目前其病因及发病机制未明,缺乏根治疗法,且有明确癌变风险^[3]。近年来,UC的发病率在全球范围内呈现上升趋势,对患者的生活质量造成了显著影响,同时也给社会带来了沉重的经济负担。尽管现代医学在控制炎症及缓解症状方面取得了一定成效,但长期使用药物往往伴随有复发风险及不良反应。因此,寻找一种高效、副作用小、安全的药物治疗UC具有重要意义。本研究通过观察荆芥连翘汤不同给药途径对UC大鼠湿热证的作用,并基于TLR4/NF-κB/NLRP3信号通路,探讨荆芥连翘汤的作用机制,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8周龄SPF级雄性SD大鼠44只,体质量(160±20)g,购自北京华阜康生物科技有限公司。动物生产许

可证号:SCXK(京)2019-0008,动物质量合格证号:110322221100249628。大鼠在湖南中医药高等专科学校动物房饲养,相对湿度60%~65%,温度(25±1)℃,12 h/12 h明暗循环照明,无进食、饮水限制。实验经湖南中医药高等专科学校动物伦理委员会审查通过(批件编号:DWLL202404006)。

1.2 药物与试剂 荆芥连翘汤组成:荆芥10 g,连翘10 g,生地黄10 g,白芍20 g,当归10 g,川芎10 g,黄芩10 g,黄连10 g,黄柏10 g,梔子10 g,柴胡12 g,枳壳10 g,防风20 g,白芷10 g,桔梗10 g,薄荷3 g,甘草10 g。中药均购自湖南中医药高等专科学校第一附属医院中药房,经湖南中医药高等专科学校第一附属医院张建新主管药师鉴定为正品。药物浸泡30 min后,加水没过药面5 cm,武火煎至沸腾后改文火,继续煎煮20 min,取汁另置。继续加水,煎煮沸腾后,文火续煎20 min,取汁。两次药汁合并后浓缩至每毫升含生药2 g,并用离心机去除药汁中残渣,4 ℃保存备用;美沙拉嗪缓释颗粒(上海爱的发制药有限公司,批号:H20143164);大鼠白细胞介素-10(IL-10)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:MM-0195R1)、大鼠白细胞介素-1β(IL-1β)ELISA试剂盒(批号:MM-0047R1)和大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)ELISA试剂盒(批号:MM-0180R1)

均购于江苏酶免实业有限公司;TLR4一抗(批号:16c5074)、NF-κB一抗(批号:AF8005)、NLRP3一抗(批号:DF7438)、Pro-IL-1β一抗(批号:AF4006)、Caspase-1一抗(批号:AF5418)均购自Affinity公司;IL-1β一抗(批号:bs-0812R)和ASC一抗(批号:bs-6741R)均购自Bioss公司;辣根酶标记山羊抗兔IgG二抗(H+L)(中杉金桥,批号:ZB-2305);Gsafre Red plus核酸染料(GLPBIO公司,批号:GK20002);超纯RNA提取试剂盒(批号:CW0581M)和miRNA提取试剂盒(批号:24921)均购自康为世纪;6×DNA Loading Buffer (TRANS公司,批号:GH101-01);ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (批号:7E670L2)、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(批号:027E2232ED)、miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop)(批号:MR101-02) 和miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix (批号:MQ101-02) 均购自Vazyme公司;50bp DNA Ladder(TIANGEN公司,批号:MD108)。

1.3 主要仪器 Tiss-12型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司);D1008E型微型离心机(SCJLOGEX公司);TD-4M型常温离心机(BIOBASE公司);H1750R型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);BDF-86V348型-80℃冰箱(BIOBASE公司);DW-25L262型医用低温保存箱(Haier);NP80型紫外分光光度仪(NanoPhotometer);DYY-8C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);ChemiDocTM XRS+型超高灵敏度化学发光成像系统仪、CFX Connect™实时荧光PCR仪均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;TC-EA型PCR扩增仪(杭州博日科技有限公司);BX43型显微镜(Olympus公司)。

1.4 造模与分组 按照随机原则,将SD大鼠分为5组:正常组、模型组、西药组、灌胃组及灌肠组,每组11只。SD大鼠适应性饲养7 d后,除正常组外,其他组采用复合模型的造模方法(饮食因素+环境因素+TNBS-乙醇灌肠)造成溃疡性结肠炎(大肠湿热证)大鼠模型^[4-5]。造模动物给予高糖高脂饲料,自由饮水,放于温度(33±2)℃、湿度85%~90%的人工湿热箱中,持续10 d。在第11天禁食不禁水24 h,采用10%水合氯醛进行腹腔注射麻醉后,将5%TNBS和50%乙醇按1:1比例配置,采用直径2 mm的硅胶管将TNBS(100 mg/kg)混悬液缓慢注入大鼠结肠,深度距肛门7~9 cm,固定大鼠尾巴并保持倒立10 min,使药液与结肠充分接触,待麻醉清醒后正常喂养。每日观察并记录大鼠饮水、进食、活动等一般情况及粪便性状、隐血情况,2 d后正常组和各造模组随机抽取2只进行HE染色。若大鼠出现腹泻、血便、体质量下降等表现,结肠组织溃疡形成,HE染色见黏膜层及黏膜下层炎症细胞浸润则说明造模成功。

1.5 实验给药 造模成功后,西药组采用美沙拉嗪[0.42 g/(kg·d)]进行灌胃,1次/d;灌胃组、灌肠组分别采用荆芥连翘汤[38.84 g/(kg·d)]进行灌胃、灌肠;正常组、模型组给予0.9%氯化钠注射液20 mL/kg灌胃;连续2周。以上给药浓度计算方法参照《中医药理研究方法学》^[6],按照实验动物与人体质量计算给药剂量。其间每日观察小鼠一般情况、症状,检测大便潜血情况、记录粪便性状、测量体质量,计算疾病活动指数(DAI)。

1.6 取材 最后1次灌胃后所有大鼠禁食不禁水24 h后,经腹主动脉采血,分离血清后,放入-20℃低温冰箱保存。采血后,脱颈椎法处死大鼠,取出全部结肠,并沿纵轴剖开,观察大鼠结肠黏膜的病变情况。

1.7 观察指标

1.7.1 一般行为观察及疾病活动指数(DAI)评分 观察大鼠形体、活动、大便性状,称重,计算,参照文献[7]进行DAI评分。DAI评分=(体质量下降评分+大便性状评分+大便隐血评分)/3。其中,体质量下降指数(%)=(给药前体质量-给药后体质量)/给药前体质量×100%。DAI分值越高,提示炎症越重。评分标准见表1。

表1 疾病活动指数(DAI)评分标准

评分	体质量下降/%	大便性状	大便隐血
0分	0	正常	隐血试验(-)
1分	1~5	轻度松散	隐血试验(-)
2分	5~10	稀便	隐血试验(+)
3分	10~15	水样便	隐血试验(+)
4分	>15	严重腹泻	肉眼便

1.7.2 大鼠结肠黏膜组织HE染色病理变化 取大鼠结肠黏膜组织样本,经70%、80%、90%各级乙醇溶液脱水,纯酒精、二甲苯等量混合液15 min,二甲苯 I 15 min、II 15 min(至透明为止)。放入二甲苯和石蜡各半的混合液15 min,再放入石蜡 I、石蜡 II 透蜡各50~60 min。石蜡包埋,切片。将石蜡切片进行烤片,然后脱蜡,水化。将已入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色3 min,盐酸乙醇分化液分化15 s,稍水洗,返蓝液返蓝15 s,流水冲洗,伊红染色3 min,流水冲洗,脱水透明,封片,镜检。

1.7.3 ELISA检测IL-1β、IL-10、TNF-α的表达 检测血清IL-10、IL-1β和TNF-α的表达,根据试剂盒说明进行。

1.7.4 免疫组织化学染色检测结肠组织TLR4、NF-κB、NLRP3、ASC、pro-IL-1β、Caspase-1的表达 将石蜡切片进行烤片,脱蜡、水化后,用柠檬酸缓冲液进行抗原修复,将切片移入湿盒中,加入新鲜配制的3%双氧水,以去除内源性过氧化物酶封闭液,室温孵育10 min,PBS充分淋洗,滴加5%BSA进行非特异性封闭。用TLR4(1:100)、I-KB(1:100)、ASC抗体(1:200)、Caspase-1抗体(1:100)、IL-1β抗体(1:200)、NLRP3抗体(1:100)、Pro-IL-1β抗体(1:100)进行一抗孵育,4℃过夜后,进行辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:100)孵育,经DAB显色,苏木精复染反蓝,脱水透明后,封片,在显微镜下进行观察。

1.7.5 qRT-PCR检测TLR4 mRNA的表达 称取大鼠结肠组织进行匀浆,采用RNA超纯提取试剂盒提取细胞RNA,利用紫外可见分光光度计测定RNA的浓度和纯度(OD260/OD280),通过RNA逆转录试剂盒分别合成cDNA,利用荧光PCR仪进行qRT-PCR检测,操作按试剂盒说明书进行。反应体系如下:2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL、cDNA 1 μL、上游引物0.4 μL、下游引物0.4 μL、RNase Free dH2O 8.2 μL。GAPDH作为内参,检测TLR4基因的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。扩增引物序列见表2。

表2 引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
GAPDH	F:GACAACTTGGCATCGTGGA R:ATGCAGGGATGATGTTCTGG	133
TLR4	F:AATCCCTGCATAGAGGTAGTTC R:TCAAGGGTTGAAGCTCAGA	121

1.8 统计学方法 应用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料采用“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用S-N-K法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

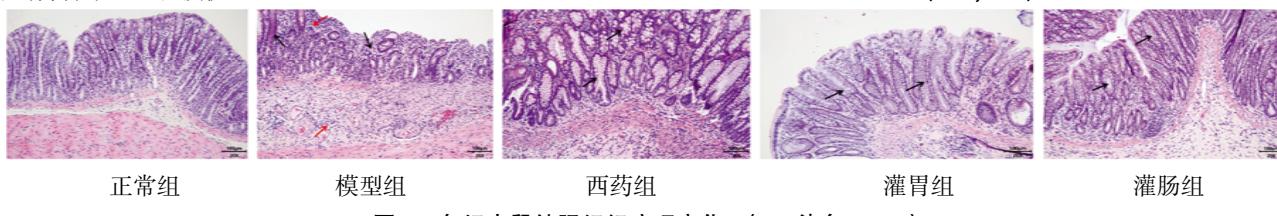
2.1 一般行为观察及疾病活动指数(DAI)评分 正常组大鼠在实验过程中一般行为无明显异常,毛发柔顺有光泽,善食好动,精力充沛。其余各组大鼠在造模处理后均表现出毛发暗淡无光泽、行动迟缓、食欲不佳、精神不振、拱背聚群等现象,并伴有不同程度的腹泻、便血、体质量下降。给予荆芥连翘汤和美沙拉嗪干预后,大鼠一般情况及肠道症状均有不同程度减轻。疾病活动指数评分显示:与正常组比较,模型组小鼠DAI评分明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,西药组、灌肠组、灌胃组大鼠DAI评分明显降低($P < 0.05$);与西药组比较,灌肠组DAI评分升高,灌肠组DAI评分则差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表3)。综上可知,荆芥连翘汤可有效改善造模大鼠的一般行为,降低疾病活动指数,且灌肠组与西药组无明显差异。

表3 各组大鼠 DAI 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

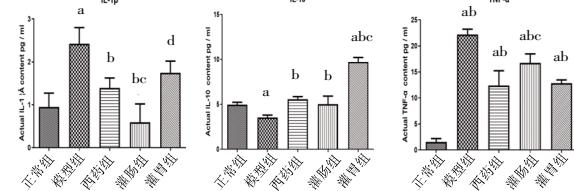
组别	n	DAI评分
正常组	9	0.000±0.000
模型组	9	5.910±0.211 ^a
西药组	9	2.456±0.201 ^b
灌胃组	9	3.522±0.192 ^{bc}
灌肠组	9	2.366±0.180 ^b
F		7.258
P		0.000

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与西药组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.2 结肠组织HE染色病理变化 HE染色显示,正常组大鼠结肠组织结构正常,肠黏膜杯状细胞丰富无损伤;与正常组比较,模型组结肠组织结构紊乱,杯状细胞(黑色箭头)数量明显减少,黏膜下层有大量炎症细胞浸润(红色箭头),肠黏膜变薄,毛细血管充血,亦可见炎症细胞浸润;与模型组比较,西药组、灌胃组、灌肠组大鼠的结肠组织结构较完整,肠黏膜趋于正常,杯状细胞增多,炎症细胞浸润情况改善(见图1)。综上可知,荆芥连翘汤不管灌胃还是灌肠均可改善炎症,降低结肠组织损伤。

图1 各组大鼠结肠组织病理变化 (HE染色, $\times 200$)

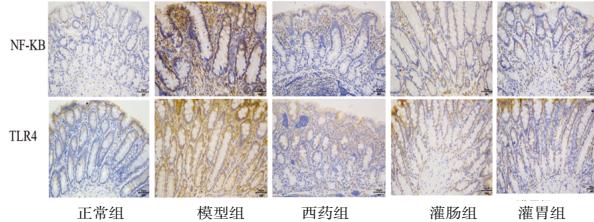
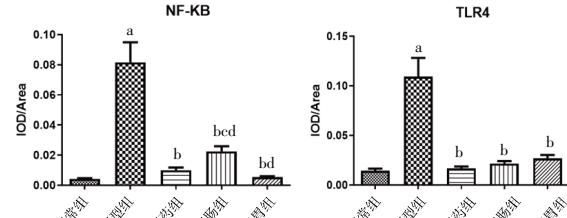
2.3 ELISA检测血清中IL-1 β 、IL-10、TNF- α 水平 与正常组比较,模型组血清IL-1 β 、TNF- α 上升,IL-10下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,西药组、灌肠组、灌胃组血清IL-10升高,TNF- α 降低($P < 0.05$)。与西药组比较,灌肠组IL-1 β 降低,TNF- α 上升,灌胃组IL-10显著上升;与灌胃组比较,灌肠组IL-1 β 、IL-10下降($P < 0.05$)(见图2)。综上可知,荆芥连翘汤能有效减少炎症因子的生成,增加抑炎因子的表达,且在降低IL-1 β 方面更具优势,且灌肠组效果优于灌胃组,而升高抑炎因子IL-10方面,灌胃组较灌肠组明显。



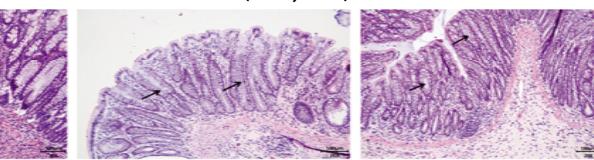
注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与西药组比较,^c $P < 0.05$;与灌肠组比较,^d $P < 0.05$ 。

图2 各组大鼠IL-1 β 、IL-10、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

2.4 免疫组化结果分析 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织TLR4、NF- κ B表达均上升;与模型组比较,西药组、灌肠组、灌胃组大鼠TLR4、NF- κ B表达均下降($P < 0.05$);与灌肠组比较,灌胃组NF- κ B表达下降($P < 0.05$)。而西药组、灌肠组、灌胃组TLR4表达比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见图3~4)。综上可知,荆芥连翘汤能减少结肠组织中TLR4表达,减少NF- κ B活化。

图3 各组大鼠结肠组织中 TLR4、NF- κ B 蛋白表达免疫组化图片 ($\times 400$)

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与西药组比较,^c $P < 0.05$;与灌肠组比较,^d $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠结肠组织中 TLR4、NF- κ B 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

与正常组比较,模型组结肠组织中NLRP3、pro-IL-1 β 、ASC、Caspase-1和IL-1 β 表达增加,其中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 表达均上升;与模型组比较,西药组、灌肠组和灌胃组中NLRP3、pro-IL-1 β 、ASC、Caspase-1、IL-1 β 表达均降低,其中Caspase-1、pro-IL-1 β 的表达灌胃组略大于灌肠组,IL-1 β 、NLRP3的表达灌肠组略大于灌胃组。西药组、灌肠组和灌胃组大鼠结肠组织中ASC表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (见图5~6)。综上可见,荆芥连翘汤能减少NLRP3炎症小体的启动和活化,减少炎症因子IL-1 β 的生成,且灌肠与灌胃给药效果无显著差异。

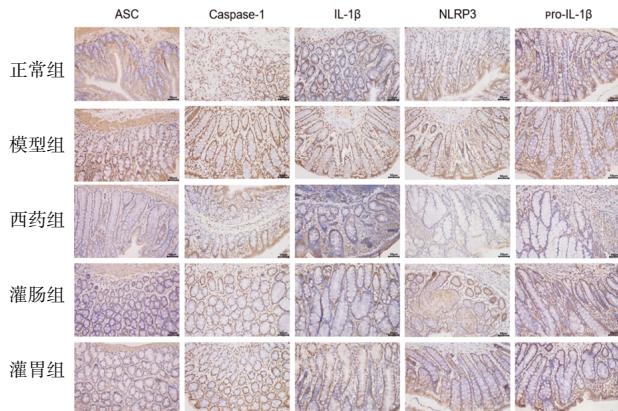
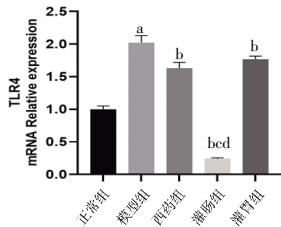


图5 各组大鼠结肠组织中ASC、Caspase-1、IL-1 β 、NLRP3和pro-IL-1 β 表达免疫组化图片(×400)

2.5 qRT-PCR检测TLR4 mRNA表达情况 与正常组比较,模型组TLR4 mRNA表达上升。与模型组比较,西药组、灌胃组大鼠TLR4 mRNA表达均下降。与西药组、灌胃组比较,灌肠组TLR4 mRNA表达下降($P<0.05$) (见图7)。综上可知,荆芥连翘汤能下调TLR4 mRNA表达,灌肠组TLR4 mRNA下调较西药组、灌胃组显著。



注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与西药组比较,^c $P<0.05$;与灌胃组比较,^d $P<0.05$ 。

图7 各组大鼠TLR4 mRNA表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

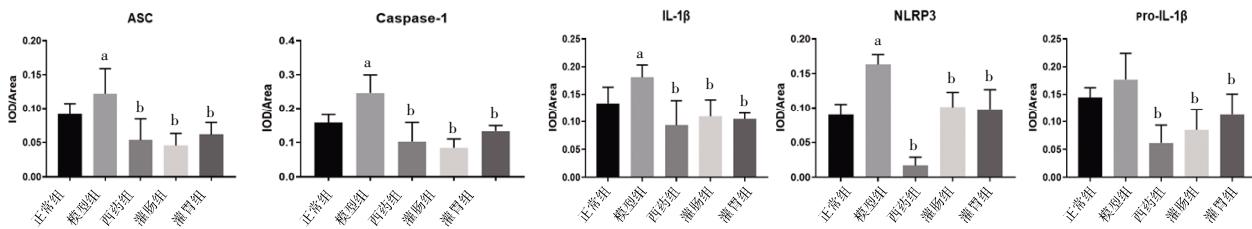
3 讨 论

目前UC的病因和发病机制复杂且尚未完全阐明,多数观

点认为其是在遗传、环境、肠黏膜屏障、肠道微生态、免疫应答和线粒体病等因素共同作用下引起的^[8~9]。目前UC的西医治疗主要以药物治疗为主,常用治疗药物包括5-氨基水杨酸、抗菌药、糖皮质激素、免疫抑制剂、生物制剂单克隆抗体等,其中,美沙拉嗪是5-氨基水杨酸药物的代表性药物,是治疗轻中度UC的一线用药。但这些药物存在疗效有限、副作用较多、费用昂贵及高复发率等问题^[10~11]。近年来临幊上也开展了高压氧治疗、粒细胞/单核细胞吸附(GMA)疗法、粪便菌群移植、微生态制剂、干细胞治疗等非药物疗法^[12~16],但尚缺乏大量临床数据,有待进一步研究。综上所述,目前西医治疗UC总体上效果不甚理想。

中医学中无“溃疡性结肠炎”病名,但根据其临床症状常将其诊断为“肠风”“泄泻”“痢疾”“大瘕泄”等,可辨为大肠湿热证、热毒炽盛证、寒热错杂证、肝郁脾虚证、脾胃虚弱证、脾肾阳虚证及阴血亏虚证,其中大肠湿热证最多见^[17]。目前,有诸多医家积极探索中医药对UC的防治作用及机制,主要集中在单味中药、中药复方、针灸治疗、灌肠治疗、中药栓剂纳肛、中西医结合等方面。近年来,越来越多的研究表明,中医药能够通过多靶点、多途径的方式,改善UC患者的症状并提高其生活质量,尤其是通过调控免疫反应、抗氧化应激及肠道菌群等途径展现出良好的效果。中医药内服、外用兼施,用药灵活、毒副作用较小,在缓解UC症状、预防复发方面有独特的优势,有良好的应用前景^[18]。

荆芥连翘汤(荆芥、连翘、防风、川芎、当归、白芍、柴胡、枳壳、黄芩、栀子、白芷、桔梗、甘草)最早见于明代龚廷贤《万病回春·卷五》,主要用于治疗蓄脓症、中耳炎、耳鸣耳聋等耳鼻疾病。20世纪初,日本一贯堂森道伯在该方基础上加生地黄、黄连、黄柏、薄荷,仍名荆芥连翘汤(本研究采用该荆芥连翘汤),用于治疗“解毒质”所发生之诸病,如腺病性体质、过敏性体质、皮肤浅黑色、湿疹等。该组方疗效显著,同时亦逐渐取代古方,现国内和日本使用的荆芥连翘汤多指此方。随着基础与临床应用研究的深入,荆芥连翘汤适应证不断扩大,其范围已涵盖至呼吸道、消化道、皮肤、妇科、风湿免疫等系统相关疾病,其中消化道黏膜及皮肤疾病为重点应用及研究方向。从组方上看,荆芥连翘汤由黄连解毒汤(《外台秘要》)、四逆散(《伤寒论》)及四物汤(《和剂局方》)等方组成,具有泻火解毒兼理气和血、调和肝脾之效。黄连解毒汤、四逆散、四物汤均有报道用于UC治疗^[19~22]。荆芥连翘汤集三方于一体,临床应用广泛,治疗消化道黏膜疾病的疗效也得到众多研究的支持,并被应用于UC的临床治疗中^[23~24],但多未深入研究其作



注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

图6 各组大鼠结肠组织中ASC、Caspase-1、IL-1 β 、NLRP3和Pro-IL-1 β 表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

用机制。明确荆芥连翘汤对溃疡性结肠炎的作用机制,加强对荆芥连翘汤的开发,对于提高溃疡性结肠炎的治疗效果,具有重要的意义。

Toll样受体(toll-like receptor, TLR)是先天免疫系统中模式识别受体之一,在抗炎免疫中发挥重要作用。TLR与临床炎症性疾病密切相关。TLR4作为信号转导受体家族一员,最重要的生物学功能是促进炎症细胞因子合成和释放。TLR4表达显著上调,可导致核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)激活并磷酸化入核,调控炎症因子(如IL-1 β 、IL6、TNF- α 等)在血液和组织中的表达,引起炎症反应。而炎症因子又可以反过来进一步活化NF- κ B,促进炎症反应。近年来,TLR4/NF- κ B信号通路已被证实参与炎症反应影响UC发生、发展的各个环节^[25-28]。

核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)是近年来炎症研究领域的热点之一,是胞内参与多种炎症反应的重要模式识别受体,为启动并放大炎症反应的感受装置,可识别多种病原相关分子,活化炎性凋亡蛋白酶胱天蛋白酶(cysteinyl aspartate specific proteinase 1, Caspase-1),促进IL-1 β 、IL-18等炎症因子的成熟与分泌^[29-30],加重炎症反应。近年研究^[31]发现,NLRP3参与UC发病,且针对NLRP3的靶向治疗可能是防治UC的方法之一。NLRP3炎症小体的启动常由LPS触发,完成NLRP3炎症小体蛋白、Caspase-1前体蛋白和IL-1 β 前体蛋白的合成^[31],为后续NLRP3炎症小体的激活提供材料。现有研究^[32]证实,NF- κ B通路是参与炎症小体启动的关键信号通路。配体刺激TLR4,导致NF- κ B激活并磷酸化入核,从而启动NLRP3炎症小体活化。NLRP3炎症小体激活可由多种刺激因素诱发,目前研究较为明确的包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)、离子流(Ca²⁺内流或K⁺外流)和溶酶体失稳态^[33],促使NLRP3蛋白与Caspase-1前体蛋白以及接头蛋白ASC组装,形成NLRP3炎症小体复合物,生成具有剪切活性的Caspase-1,进而剪切IL-1 β 和IL-18前体蛋白,形成具有强烈致炎活性的成熟形式。氧化应激介导的ROS是激活NLRP3炎症小体最为关键的因素^[34]。

本实验结果显示,荆芥连翘汤能明显减少结肠组织炎症细胞浸润,使血清中抑炎因子IL-10显著上升,IL-1 β 、TNF- α 显著降低,使大鼠DAI评分明显降低。这表明荆芥连翘汤对UC大肠湿热证大鼠具有明显的炎症抑制和症状改善作用。而模型大鼠经荆芥连翘汤灌胃或灌肠后,结肠组织中TLR4 mRNA和TLR4、NF- κ B、NLRP3、ASC、Caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 蛋白表达显著下降。因此,笔者认为荆芥连翘汤可能是通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路对NLRP3炎症小体激活产生抑制,进而抑制NLRP3炎症小体介导的炎症反应。此外,从实验结果看,灌肠组在降低炎症因子IL-1 β 、抑制TLR4 mRNA表达方面优于灌胃组,这可能与灌肠治疗,可以直达病位,从而提高疗效有关。免疫组化检测结果提示,灌胃组和灌肠组之间TLR4表达无差异,但qRT-PCR结果显示TLR4 mRNA表达存在差异。mRNA与蛋白表达不同步,分析这可能与检测方

法灵敏度差异有关,或者可能因翻译抑制或蛋白降解加速导致蛋白表达未变化。研究组下一步将使用使用TLR4激动剂刺激两组细胞或组织,观察下游信号NF- κ B等的激活情况,验证TLR4功能是否受mRNA差异影响。免疫组化检测结果提示灌胃组和灌肠组IL-1 β 蛋白表达无差异,但是ELISA方法检测结果存在差异,这可能因为IL-1 β 是分泌型细胞因子,在组织中表达较少或更多以前体形式存在,无法显示细微差异。

综上,本实验证实了荆芥连翘汤治疗UC的价值,同时揭示了荆芥连翘汤发挥治疗价值的分子机制。荆芥连翘汤通过影响TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路,抑制NLRP3炎症小体介导的炎症反应可能是其治疗UC的分子机制之一。中医药治疗UC具有多靶点、多途径、多通路、整体性等特点,荆芥连翘汤对UC的作用机制仍有待深入研究,项目组将进一步探讨具体的调控机制、明确关键成分与靶点,明确量效关系,探讨与其他通路的相互交叉与影响,以期为临床治疗UC提供新的靶点和思路。

参考文献

- [1] 中国中西医结合学会.溃疡性结肠炎中西医结合诊疗专家共识[J].中国中西医结合杂志,2023,43(1):5-11.
- [2] 史瑞,李军祥,沈洪,等.溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识(2023)[J].中华中医药杂志,2024,39(1):288-296.
- [3] 中国中西医结合学会,魏玮.溃疡性结肠炎中西医结合诊疗指南[J].中国中西医结合杂志,2024,44(9):1029-1035.
- [4] 张慧俭,周鹏飞,刘世举,等.消溃方灌肠治疗溃疡性结肠炎模型大鼠的作用机制研究[J].北京中医药大学学报,2019,42(7):577-583.
- [5] 尹园缘,宾东华,刘颖,等.溃疡性结肠炎病证结合动物模型的制备与评价[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(15):207-215.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2022:202-203.
- [7] LI Q M, CUI Y, XU B C, et al. Main active components of Jiawei Gegen Qinlian decoction protects against ulcerative colitis under different dietary environments in a gut microbiota-dependent manner[J]. Pharmacol Res,2021,170:105694.
- [8] 黄水兰,张磊昌,高强强,等.中医药防治溃疡性结肠炎机制研究进展[J].辽宁中医杂志,2024,51(7):206-212.
- [9] SINGH N, BERNSTEIN C N. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease[J]. United European Gastroenterol J,2022,10(10):1047-1053.
- [10] KITSOU K, KOKKOTIS G, RIVERA-NIEVES J, et al. Targeting the sphingosine-1-phosphate pathway: New opportunities in inflammatory bowel disease management[J]. Drugs,2024,84(10):1179-1197.
- [11] MASSIRONI S, FURFARO F, BENCARDINO S, et al. Immunity in digestive diseases: New drugs for inflammatory bowel disease treatment—insights from Phase II

- and III trials[J]. J Gastroenterol, 2024, 59(9):761–787.
- [12] 王娜,霍丽娟.粒细胞/单核细胞吸附疗法治疗溃疡性结肠炎的效果及安全性[J].国际消化病杂志,2024,44(2):75–79.
- [13] 梁丽娟,赖卫国,朱春平,等.溃疡性结肠炎中肠道菌群相关治疗的研究进展[J].南昌大学学报(医学版),2023,63(4):94–99.
- [14] 陈婷婷,江学良,余佳丽,等.干细胞治疗炎症性肠病的安全性[J].中华消化病与影像杂志(电子版),2023,13(4):193–198.
- [15] 宫雪晴,刘同亭,范兰馨.粪菌移植治疗溃疡性结肠炎系统评价/meta分析的再评价[J].胃肠病学,2023,28(6):335–343.
- [16] 陈晓芬,陈钰涵,马娟.炎症性肠病新型治疗方法的研究进展[J].中国全科医学,2023,26(27):3349–3354.
- [17] 覃靖燊,张馨月,朱梓铭,等.溃疡性结肠炎中医证候要素及其辩证分型评述[J].陕西中医药大学学报,2024,47(4):7–11.
- [18] WANG T C, LIUX Y, ZHANGW J, et al. Traditional Chinese medicine treats ulcerative colitis by regulating gut microbiota, signaling pathway and cytokine: Future novel method option for pharmacotherapy[J]. Heliyon, 2024, 10(6):e27530.
- [19] 史艳,祝亚梅,蔡燕子,等.基于文献和系统药理学的黄连解毒汤治疗溃疡性结肠炎药效物质基础及其作用机制研究[J].中国野生植物资源,2023,42(6):1–8.
- [20] 翁学运,陈克山,林书仲,等.左金丸合四逆散对溃疡性结肠炎炎症因子、YKL-40的影响研究[J].中华中医药学刊,2022,40(6):165–168.
- [21] 单佳铃,胡伟琼,谢勤,等.基于网络药理学及分子对接探讨四逆散对溃疡性结肠炎与抑郁症“异病同治”的作用机制[J].中药新药与临床药理,2024,35(1):83–91.
- [22] 杨维肖,李毅,李荣荣,等.四君子汤治疗溃疡性结肠炎研究进展[J].中医药导报,2021,27(2):92–96,100.
- [23] 白鹏飞,张艳君,李敏.荆芥连翘汤加减从肺论治溃疡性结肠炎疗效及对患者肠黏膜屏障功能、免疫调节、氧化应激指标的影响[J].陕西中医,2020,41(7):897–900.
- [24] 许莉嘉.荆芥连翘汤加减治疗溃疡性结肠炎的疗效观察[J].中国现代药物应用,2021,15(8):205–207.
- [25] SHERIFI O, AL-SHAALANN H, AWADINW F. Rutin mitigates acetic acid-induced ulcerative colitis: Novel coloprotective mechanism[J]. Toxicol Res, 2024, 13(4):tfae108.
- [26] 张钰异,王浩,王思琳,等.中医药调控NF-κB相关信号通路干预溃疡性结肠炎相关性癌变的研究进展[J].中国中药杂志,2024,49(6):1455–1466.
- [27] 黄星星,任晓芳,张聪伟,等.中药复方干预TLR4/NF-κB相关通路治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2022,31(21):3031–3035.
- [28] 贾福运,高望.基于Toll样受体4/核因子-κB信号通路中医药干预溃疡性结肠炎作用机制的研究进展[J].环球中医药,2022,15(9):1729–1735.
- [29] 李陈广,麦凤怡,梁靖蓉,等.NLRP3炎症小体抑制剂的研究进展[J].中国药理学通报,2024,40(10):1801–1808.
- [30] 赵双梅,邵祖燕.基于NLRP3炎症小体相关信号通路探讨中医药治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J].江西中医药,2023,54(5):77–80.
- [31] 赵冠宇,辛蕊华,王颖,等.中药复方调控NLRP3炎症小体相关信号通路治疗溃疡性结肠炎研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(17):305–314.
- [32] WANG K P, YANG X W, WU Z J, et al. Dendrobium officinale polysaccharide protected CCl₄-induced liver fibrosis through intestinal homeostasis and the LPS-TLR4-NF-κB signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:240.
- [33] 张坦.NLRP3炎症小体活化机制研究进展[J].生命科学,2023,35(7):903–909.
- [34] DOMINIC A, LEN T, TAKAHASHI M. Loop between NLRP3 inflammasome and reactive oxygen species [J]. Antioxid Redox Signal, 2022, 36(10–12):784–796.

(收稿日期:2025-04-21 编辑:罗英姣)