

葡萄籽提取物与柳氮磺吡啶联合用药对实验性溃疡性结肠炎的作用

全 帅^{1,2}, 吕开原^{1,2}, 赵艳敏², 孙华庚³, 胡 骁^{2*}, 刘 丹³, 刘岱琳^{1,2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 武警后勤学院, 天津 300309

3. 天津尖峰天然产物研究开发有限公司, 天津 300457

摘要:目的 研究葡萄籽提取物(GSPE)与柳氮磺吡啶(SASP)联合用药治疗葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎的效果及作用机制。方法 将SPF级C57小鼠随机分为对照组、模型组、GSPE(250 mg/kg)组、SASP(250 mg/kg)组、联合用药(SASP 250 mg/kg+SASP 250 mg/kg)组,对照组给予正常饮用水,其他组均自由饮用3% DSS水溶液,连续饮用7 d,诱发小鼠溃疡性结肠炎模型;造模第1天同步开始ig给药,每天记录小鼠体质量、便血、便型等症状变化;7 d后断头取血,收集结肠和脾脏,记录结肠长度、脾脏质量变化情况。HE染色评估小鼠结肠黏膜组织病理变化,ELISA法检测血清和结肠组织中炎症因子肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和NO的表达变化以及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)细胞因子的含量变化,免疫组化分析结肠组织上皮细胞中NF- κ B-p65、Nrf2、HO-1和Keap-1含量的变化。应用金氏Q值法分析联合用药的作用效果。**结果** 与模型组比较,各给药组的小鼠体质量下降幅度显著降低($P < 0.01$),小鼠腹泻、便血症状改善明显,其中联合用药组小鼠体质量较单独给药组下降更缓,小鼠腹泻、便血程度改善更明显($P < 0.05$)。各给药组小鼠血清及结肠组织中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、MDA含量较模型组显著降低,SOD含量则显著升高($P < 0.01$);病理组织切片分析发现,各给药组小鼠结肠黏膜病理损伤较模型组显著减轻,其中联合用药组小鼠结肠黏膜病理损伤较单独给药组降低更为显著($P < 0.05$)。免疫组化分析结果也显示,各给药组小鼠的NF- κ B-p65、Keap-1蛋白表达与模型组比较显著下调($P < 0.01$),Nrf2、HO-1蛋白表达显著上调($P < 0.01$)。联合给药组与单独给药组比较,NF- κ B-p65、Keap-1蛋白表达显著降低($P < 0.05$),Nrf2、HO-1蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。金氏Q值法评价两药合用后对IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、MDA、NF- κ B-p65、Keap-1的作用效果均大于1.15,说明GSPE与SASP具有协同作用。**结论** GSPE与SASP联合用药治疗实验性溃疡性结肠炎效果优于单独给药,联合用药增强GSPE和SASP的抗氧化和抗炎作用,GSPE与SASP配伍治疗溃疡性结肠炎可进一步发挥协同增效的作用。

关键词: 葡萄籽提取物; 柳氮磺吡啶; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; 炎症; 联合用药

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)03-0478-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.03.003

Study on combined treatment of grape seed extract and sulfasalazine for experimental ulcerative colitis

QUAN Shuai^{1,2}, LÜ Kaiyuan^{1,2}, ZHAO Yanmin², SUN Huageng³, HU Xiao², LIU Dan³, LIU Dailin^{1,2}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

3. Tianjin Jianfeng Natural Products R & D Co. Ltd., Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of grape seed extract combined with sulfasalazine on DSS-induced ulcerative colitis (UC) in mice. **Methods** SPF grade C57 mice were randomly divided into five groups: control group, model group, grape seed extract group (GSPE, 250 mg/kg), sulfasalazine group (SASP, 250 mg/kg) and the combination medicine group [GSPE

收稿日期: 2020-06-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673693); 武警后勤学院创新团队基金项目(2019); 武警后勤学院博士启动金(WHB201710); 武警后勤学院基础研究项目(WHJ201905)

第一作者: 全 帅,男,硕士研究生,研究方向为天然产物活性成分研究。E-mail: quanshuai2017@163.com

*通信作者: 刘岱琳,女,教授,研究方向为天然产物活性成分。E-mail: dailinlch@163.com

胡 骁,男,讲师,研究方向为天然产物活性成分。E-mail: huxiao@163.com

(250 mg/kg) + SASP (250 mg/kg)]. The control group was given normal drinking water, and the other groups were free to drink 3% DSS aqueous solution for 7 consecutive days to induce a model of UC in mice. The symptoms such as body weight, blood in the stool, and stool type were recorded every day. All mice were sacrificed after drug intervention for 7 consecutive days. Blood, colons and spleens were collected, respectively. The changes in colon length and spleen weight were recorded. HE staining was used to evaluate the pathological changes of mouse colonic mucosa. ELISA was used to detect the expression of inflammatory factors tumor necrosis factor: TNF- α , interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and NO in serum and colon tissues, as well as the changes of MDA, SOD cytokines. Immunohistochemical analysis of the changes of content of NF- κ B-p65, Nrf2, HO-1, Keap-1 were carried out in colon tissue epithelial cells. Effect of combined drug was evaluated by the Jin's *Q*-value method. **Results** Compared with model group, the body weight of mice in the GSPE group, SASP group and combination medicine group decreased slowly, and the symptoms of diarrhea and blood in the stool were significantly improved. The weight loss of the combination medicine group was slower than that of GSPE group and SASP group. Meanwhile, compared with the single administration groups, the diarrhea and bloody stools of the combination medicine group improved significantly. After administration, the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, and MDA in the serum and colon tissues of mice were significantly lower than that in the model group, and the SOD content was significantly increased ($P < 0.01$); pathological tissue analysis revealed that the pathological damage of the colonic mucosa of the mice in each administration group was significantly reduced, and the pathological damage of the colonic mucosa of the mice in the combination medicine extract was significantly lower than that of the other two groups ($P < 0.05$). Immunohistochemical analysis showed that the expression of NF- κ B and Keap-1 protein in each administration group was significantly reduced ($P < 0.01$), and the expression of Nrf2 and HO-1 protein was significantly increased ($P < 0.05$). Among them, the expression of NF- κ B-p65 and Keap-1 protein in the combination medicine group was significantly lower than that in SASP group and GSPE group ($P < 0.05$). The expression of Nrf2 and HO-1 protein in the combination medicine group were significantly higher than that in single administration groups ($P < 0.05$). The Jin's *Q*-values of the effect of combined drug on IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO, MDA, NF- κ B-p65, and Keap-1 were all greater than 1.15, which indicated that there is quite obviously synergy between GSPE and SASP. **Conclusion** Compared with single administration, the combined use of SASP and GSPE will enhance the antioxidant and anti-inflammatory effects of GSPE and SASP. The combined use of the two drugs has a synergistic effect on the treatment of UC.

Key words: grape seed extract; sulfasalazine; ulcerative colitis; oxidative stress; inflammation; combination medicine

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种发病机制尚不明确, 主要以腹痛、腹泻、血便等为主要临床表现的慢性非特异性免疫性炎性肠病^[1]。疾病发展后期会波及大段肠腔, 引发中毒性结肠炎以及结肠癌^[2], 还有可能发生肠外并发症^[3], 临床治愈率低。目前临床上治疗 UC 主要以糖皮质激素、生物制剂和免疫抑制剂为主, 这些药物会对肝脏、神经系统产生毒副作用, 且会使病情反复导致恶化^[4]。

葡萄籽提取物 (grape seed proanthocyanidins extract, GSPE) 的主要成分是低聚葡萄籽原花青素, 具有很强的抗氧化、清除自由基以及较强的抗炎活性^[6]。本课题组前期研究发现 GSPE 对葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的小鼠 UC 有较好的抑制作用^[7], 说明 GSPE 对胃肠道损伤有一定的保护作用^[8-11]。

柳氮磺吡啶 (sulfasalazine, SASP) 是水杨酸与磺胺吡啶的偶氮化合物, 为临床上治疗 UC 的一线常用药物。该药口服后在肠内分解为磺胺吡啶和氨基水杨酸, 有抗菌、消炎和免疫抑制作用^[12], 其效果显著、价格低廉。但该药常引起恶心、厌食等系

列胃肠道不良反应, 单独使用的疗效不佳, 复发率较高, 限制了其临床应用^[13-14]。

本研究利用 DSS 建立小鼠 UC 模型, 基于 Nrf2/HO-1 和 NF- κ B 信号通路, 研究 GSPE 与 SASP 联合用药对实验性 UC 小鼠的治疗效果及作用机制, 为 GSPE 的临床应用以及与 SASP 联合用药治疗 UC 提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 仪器

H1650R 低温离心机 (湘仪离心机仪器有限公司); Infinite F50 全波长酶标仪 (德国 Tecan 公司); F6/10 实验室超细匀浆机 (上海弗鲁克科技发展有限公司); DZKW-D-2 电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器厂); MX100-4A 微孔板震荡器、Mini-6K 低速离心机 (杭州奥盛仪器有限公司); 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); BX53 奥林巴斯正置显微镜 (上海奥林巴斯有限公司); Leica 2016 石蜡切片机 (上海莱卡仪器有限公司)。

1.2 药品与主要试剂

DSS (批号 Q3526, 美国 MPBIO 生物学公

司);GSPE(批号002-180502,含儿茶素22.6%、表儿茶素18.9%、原花青素B₁4.9%、原花青素B₂3.6%、原花青素B₄1.1%,天津尖峰天然产物研究开发有限公司);SASP肠溶片(批号22160712160625,上海福达制药有限公司);4%多聚甲醛(天津百倍生物科技有限公司);0.9% NaCl溶液(山东科伦药业有公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物医学工程研究所);NO试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6试剂盒(北京四柏生物科技有限公司);血红素加氧酶-1(HO-1)抗体、核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体、转录因子E2相关因子2(Nrf2)抗体、Keap-1抗体(美国Cell Signaling公司)。

1.3 实验动物

SPF级C57小鼠,35只,雄性,8周龄,体质量20~22 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供并饲养,实验动物生产许可证号SCXK(京)2017-0005,动物合格证编号1112511911000098;动物饲养于干净舒适的环境,温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度(60 \pm 5)%。

2 方法

2.1 UC模型的制备及给药效果的评价

35只SPF级C57小鼠随机分为对照组、模型组、SASP组、GSPE组、联合用药(SASP+GSPE)组^[7]。各组小鼠适应性喂养1周后,对照组给予正常饮用水,其余各组给予含有3% DSS的饮用水,诱导小鼠UC模型,自由饮用7 d,小鼠体质量开始下降并伴有便血症状时表明造模成功。造模第1天同步开始ig给药,对照组及模型组每日ig等体积蒸馏水,其余各组给药剂量如下:GSPE组(250 mg/kg),SASP组(250 mg/kg),联合用药组(GSPE 250 mg/kg+SASP 250 mg/kg)。给药后每日定时观察并记录所有小鼠的一般情况、体质量变化、大便性状、大便隐血情况,是否血便及便血程度,初步判断造模情况及给药效果。

2.2 样本采集及处理方法

连续给药至第7天后禁食不禁水24 h,第8天断头处死取血,随即解剖取脾脏和结肠肠段样本。全血样本于4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min离心10 min取血清,-80 $^{\circ}$ C保存。脾脏用生理盐水洗净表面血液,吸水纸吸干后称质量。将整个结肠肠段铺平测量长度,取1 cm结肠放入10倍体积的4%多聚甲醛溶液中,室温静置24 h进行固定。另取1 cm结肠组

织,剪开,生理盐水清洗干净,置于EP管中剪碎,加入5倍体积生理盐水进行匀浆,静置2 h后4 $^{\circ}$ C以10 000 r/min离心10 min,取上清液,-80 $^{\circ}$ C保存。

2.3 血清及结肠组织中细胞因子及炎症因子的检测

取低温保存的血清及结肠组织匀浆上清液快速复苏,按ELISA试剂盒使用方法检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO水平。

取低温保存的血清及结肠组织匀浆上清液快速复苏,按ELISA试剂盒使用方法检测SOD、MDA水平。

2.4 结肠组织HE染色后病理形态学分析

4%多聚甲醛固定保存的结肠组织,常规石蜡切片,苏木精(HE)染色,光学显微镜下观察各组小鼠结肠的形态学变化。参照Wirtz等^[15]方法对结肠损伤程度进行半定量评分。

2.5 免疫组化检测结肠组织中相关蛋白的表达

将组织石蜡切片,抗原热修复,滴加相应克隆抗体,DAB溶液室温显色,冲洗,苏木素复染,脱水,封片。采用Imagepro-plus 6.0图像分析系统计算阳性细胞染色的积分光密度与平均灰度,从而探讨GSPE对UC小鼠影响的作用机制。

2.6 联合用药的作用分析^[16]

基于Bliss Additivity零交互模型,应用金氏修正正式计算 Q 值,定量评价GSPE与SASP的相互作用。根据 Q 值即可定量评价联合用药的相互作用。一般以 $Q>1.15$ 为协同,以 $Q<0.85$ 为拮抗,介于两者之间为相加。 Q 值计算公式如下:

$$Q = (E_{GSPE} + E_{SASP}) / (E_{GSPE} + E_{SASP} - E_{GSPE} \times E_{SASP})$$

E_{GSPE} 、 E_{SASP} 分别为GSPE、SASP单用之效应, $E_{GSPE} + E_{SASP}$ 为两药合用效果

2.7 统计学处理

正态性分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,采用单因素方差分析进行组间比较。

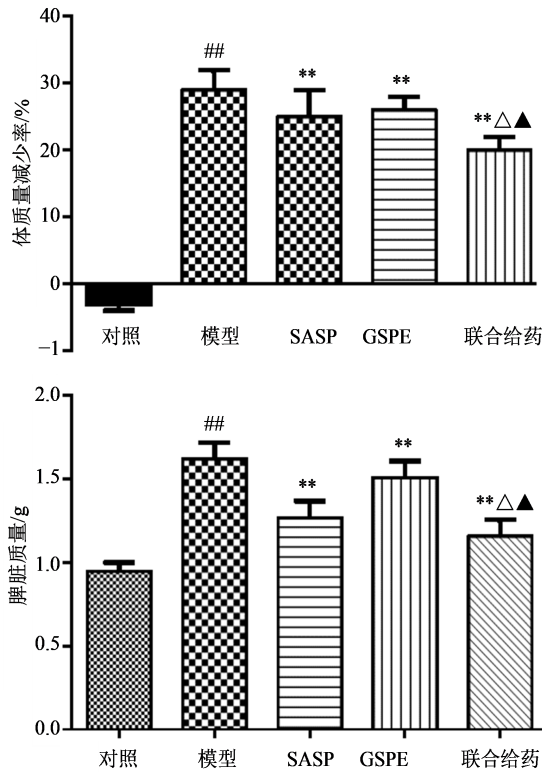
3 结果

3.1 联合用药对UC小鼠一般情况的影响

观察结果显示,对照组小鼠活动状态良好,体质量无下降、毛发光滑有光泽,模型组在造模第2天即出现腹泻,随后出现大便稀溏,第4天出现便血、行动迟缓、体质量下降精神萎靡不振、毛发黯淡无光。各给药组也出现便溏、便血等现象,但疾病症状均轻于模型组,而且联合给药组小鼠的上述症状明显轻于SASP组和GSPE组。

3.2 联合用药对UC小鼠体质量和脾脏质量的影响

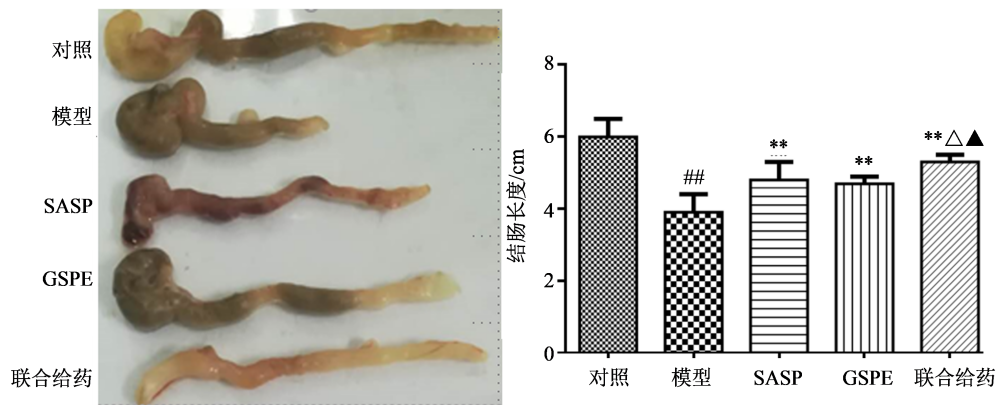
给药后小鼠体质量和脾脏质量变化情况如图1所示,与对照组比较,模型组小鼠体质量显著减少,脾脏质量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠体质量显著增加,脾脏质量显著减少($P <$



与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$;与SASP组比较: $\Delta P < 0.05$;与GSPE组比较: $\blacktriangle P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs SASP group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs GSPE group

图1 联合用药对UC小鼠体质量及脾脏质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 1 Effect of combined administration on body weight and spleen weight in mice with UC ($\bar{x} \pm s, n = 7$)



与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$;与SASP组比较: $\Delta P < 0.05$;与GSPE组比较: $\blacktriangle P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs SASP group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs GSPE group

图2 联合用药对UC小鼠结肠长度的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 2 Effect of combined administration on colon length in mice with UC ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

0.01),说明药物能减缓DSS诱发的UC小鼠的损伤。联合给药较单独给予SASP和GSPE的作用效果更加明显($P < 0.05$)。金氏Q值法评价SASP和GSPE联合使用后体质量及脾质量的变化情况,经计算得到Q值分别为1.32和1.41,表明两者联合用药的效应为协同作用。

3.3 联合用药对UC小鼠结肠长度的影响

结果如图2所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠长度显著缩短($P < 0.01$),说明DSS灌注后,小鼠出现了结肠萎缩,模型构建成功。各给药组与模型组比较,结肠长度均明显增长($P < 0.01$),说明各给药组对DSS诱发的UC有一定的治疗作用。联合用药组的结肠长度显著长于SASP和GSPE组($P < 0.05$)。金氏Q值法评价SASP和GSPE合用后对结肠长度的影响,结果显示Q值为1.30,大于1.15,表明两者合用为协同作用。

3.4 联合用药对UC小鼠结肠组织病理改变的影响

各实验组小鼠的结肠组织的HE染色分析结果如图3所示,对照组小鼠的结肠组织结构完整,无溃疡,无损伤,肠腺排列整齐且完整,黏膜未见炎性细胞浸润,肌层保持完整平滑;模型组小鼠的结肠组织结构已经被完全破坏,黏膜上层细胞脱落、坏死,大量炎性细胞浸润、充血;SASP组小鼠的结肠组织局部受到损伤,可见到部分完整的组织构造,少量炎性细胞浸润;GSPE组小鼠的结肠组织局部损伤,黏膜上皮细胞部分坏死,炎性细胞浸润程度稍弱于SASP组;联合用药组小鼠结肠组织稍有损伤,绒毛清晰,黏膜无损伤、无坏死、无炎性细胞浸润,说明联合给药抑制DSS诱发的UC的作用效果优于单独给药。

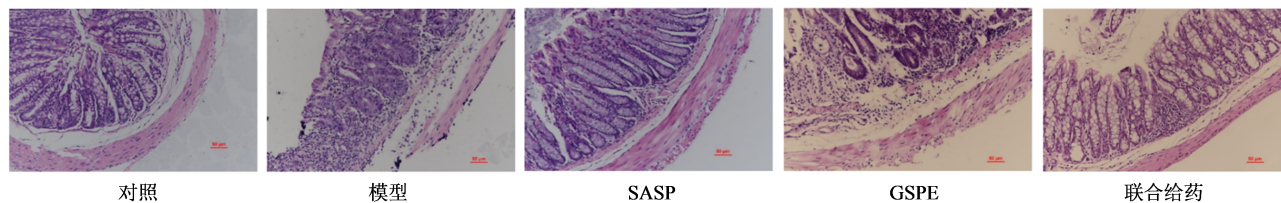


图3 联合用药对UC小鼠结肠组织病理改变的影响

Fig. 3 Effect of combined administration on pathological changes of HE staining in colon tissue of mice with UC

依据病理组织学诊断指标对实验结果进行评分,结果如表1所示,与对照组比较,模型组结肠组织病理评分明显升高($P < 0.01$),提示DSS对结肠造成严重损伤,成功诱发UC;各给药组结肠组织病理评分显著低于模型组($P < 0.05$),提示各给药组均能够有效改善DSS诱导的小鼠结肠黏膜损伤、炎症细胞浸润,其中联合用药组的效果更为明显,其结肠组织病理评分明显低于SASP组和GSPE组($P < 0.05$),病理学分析结果再次说明联合给药的作用效果优于单独给药。

3.5 联合用药对UC小鼠血清及结肠组织中炎症因子的影响

结果如图4所示,模型组小鼠的血清和结肠组织中的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NO水平显著高于对照组($P < 0.01$),说明UC造模成功。与模型组比较,各给药组小鼠血清和结肠组织中的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的水平显著降低($P < 0.01$)。两个单独给药组比较,SASP组结肠组织中IL-1 β 含量、血清及结肠组织中IL-6、TNF- α 含量比GSPE组低,具有显著性差异($P < 0.05$),表明SASP的抗炎作用要强于

表1 各组小鼠结肠组织病理评分($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Pathological scores of colon tissue of UC mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

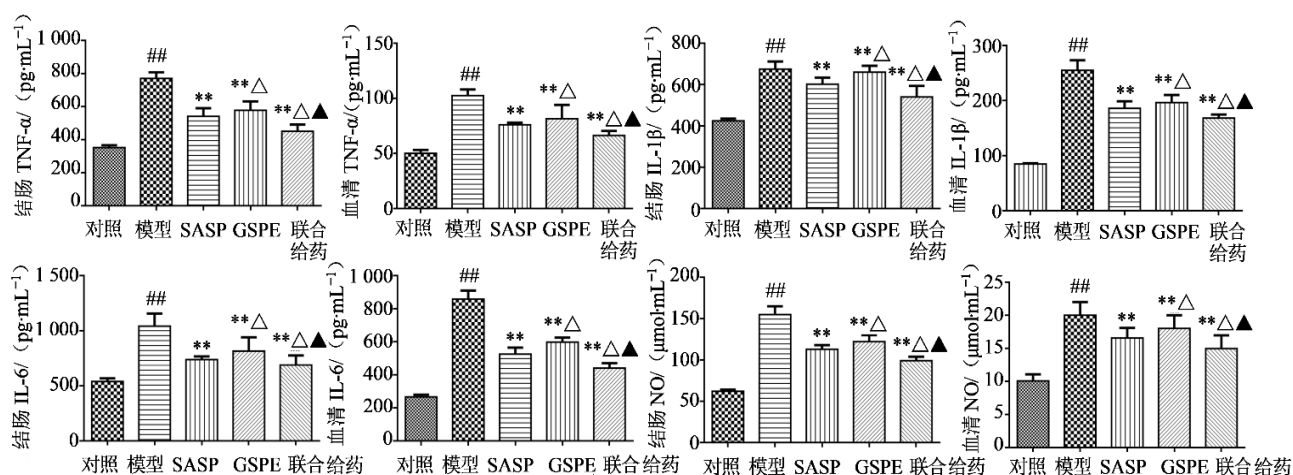
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	结肠组织病理评分
对照	—	0
模型	—	7.05±1.02 ^{##}
SASP	250	5.31±0.37 ^{**}
GSPE	250	5.96±0.86 [*]
联合给药	250+250	4.01±0.57 ^{**△▲}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与SASP组比较: [△] $P < 0.05$; 与GSPE组比较: [▲] $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs SASP group; [▲] $P < 0.05$ vs GSPE group

GSPE。联合用药组小鼠血清和结肠组织中的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的水平显著低于SASP和GSPE组($P < 0.05$),表明联合给药后的抗炎作用增强,发挥出更好的抗炎效果,使其治疗UC的效果明显优于单独给药。

NF- κ B、IL-6等细胞因子能刺激炎症细胞诱导NOS表达上调产生大量NO。NO介导IL-2诱导微血管壁通透性增高,导致结肠组织水肿和功能障



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与SASP组比较: [△] $P < 0.05$; 与GSPE组比较: [▲] $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs SASP group; [▲] $P < 0.05$ vs GSPE group

图4 联合用药对UC小鼠血清与结肠组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和NO的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

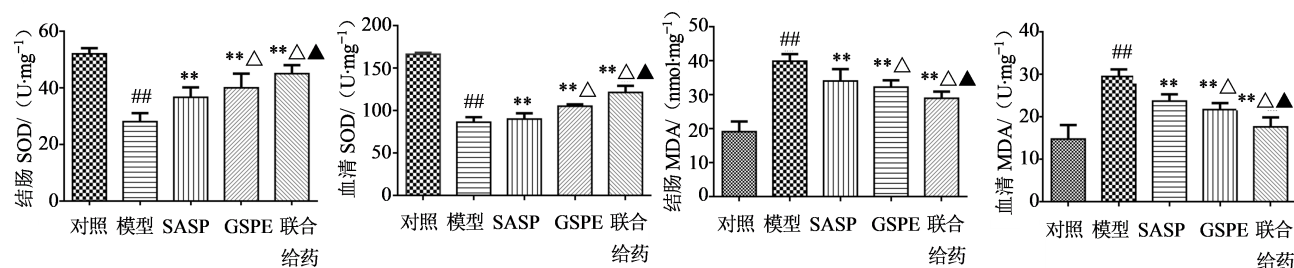
Fig. 4 Effect of combined administration on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO level in serum and colon tissue of mice with UC ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

碍,导致结肠组织充血,前列腺素产生,促进炎症发生。与模型组比较,各给药组小鼠血清和结肠组织中的NO水平显著降低($P < 0.01$)。两个单独给药组比较,SASP组结肠组织及血清中NO含量比GSPE组低,具有显著性差异($P < 0.05$),表明SASP的抗炎作用要强于GSPE。联合用药组小鼠血清和结肠组织中的NO水平显著低于SASP和GSPE组($P < 0.05$)。金氏Q值法评价SASP和GSPE联用后对TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和NO的抑制率作用效果,Q值分别为1.16、1.59、1.25和1.18,均大于1.15,表明两者联用为协同作用。

3.6 联合用药对血清及结肠组织中细胞因子的影响

细胞因子测定结果如图5所示,模型组与对照

组比较,小鼠血清和结肠组织中MDA含量显著升高,SOD含量显著降低($P < 0.01$);各给药组与模型组比较均可显著降低小鼠结肠和血清中MDA水平,升高SOD水平,具有统计学意义($P < 0.01$)。SASP与GSPE组比较,结肠组织及血清中SOD含量显著降低,MDA含量显著升高,均具有统计学差异($P < 0.05$),结果表明,GSPE的抗氧化作用比SASP强。联合用药组的SOD的含量显著高于SASP和GSPE组($P < 0.05$),MDA含量显著低于SASP和GSPE组($P < 0.05$)。金氏Q值法评价SASP和GSPE联用对SOD和MDA的影响,经计算Q值分别为1.16和1.17,结果表明两者合用的效应为协同作用。



与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$;与SASP组比较:Δ $P < 0.05$;与GSPE组比较:▲ $P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs SASP group; ▲ $P < 0.05$ vs GSPE group

图5 联合用药对UC小鼠血清与结肠组织中SOD、MDA含量变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 5 Effect of combined administration on SOD and MDA level in serum and colon tissue of mice with UC ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

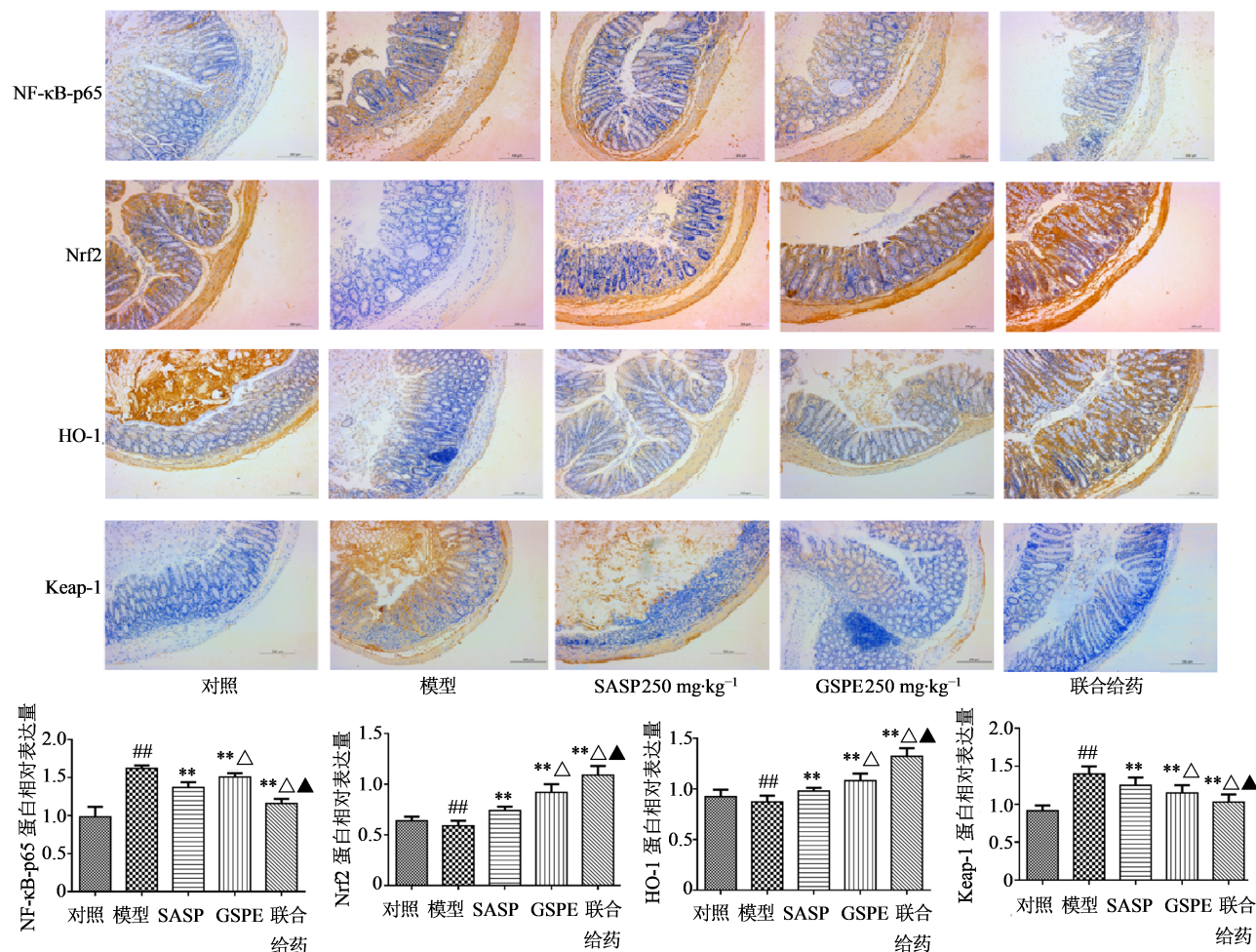
3.7 联合用药对UC小鼠结肠组织中相应蛋白表达的影响

利用免疫组化检测分析小鼠结肠黏膜中的NF- κ B-p65、Nrf2、HO-1、Keap-1的蛋白表达情况。结果如图6所示,小鼠造模后,与对照组比较,NF- κ B-p65、Keap-1的表达量显著上升($P < 0.01$),而HO-1、Nrf2的表达量显著下调($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组的NF- κ B-p65、Keap-1的表达量显著下调($P < 0.01$),而HO-1、Nrf2的表达量显著上调($P < 0.01$);SASP组的NF- κ B-p65的表达量明显低于GSPE组($P < 0.05$),SASP组的HO-1、Nrf2的表达量显著低于GSPE组($P < 0.05$)。该结果提示GSPE主要通过抗氧化的作用发挥抑制UC作用,SASP主要通过抗炎的作用发挥抑制UC作用。联合给药后NF- κ B-p65、Keap-1的表达量明显低于SASP组和GSPE组($P < 0.05$),HO-1、Nrf2的表达量明显高于SASP组和GSPE组($P < 0.05$),表明联合给药可以同时增强抗炎及抗氧化作用从而达到更好的效果。金氏Q值法评价SASP和GSPE合用后对NF- κ B和

Nrf2表达的抑制率、HO-1和Keap-1表达的增加率,Q值分别为1.44、1.17、1.31和1.15,表明两者合用的效应表现为协同作用。

4 讨论

UC是一种慢性炎症性肠病,病理改变多见大肠黏膜及黏膜下层,呈连续弥漫性分布。临床表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便和里急后重等,病程较长,易反复发作,甚至癌变,严重影响患者的生存质量^[17]。在治疗UC时常采用的西药有氨基水杨酸类、糖皮质激素类、生物制剂和抗菌药。本研究中使用的SASP属于氨基酸水杨酸类药物,主要成分包括5-氨基水杨酸与磺胺吡啶,是临床上治疗UC的常用药物。SASP对各种炎症细胞有抑制作用,它对细胞的趋化及蛋白溶解酶活性有抑制作用,减少氧自由基生成。SASP还可抑制肥大细胞合成与释放TNF- α 等^[18]。SASP通过抑制三磷酸腺苷结合,成为IKK α 和IKK β 的直接抑制剂,通过抑制IKKS来抑制NF- κ B的活性,从而发挥抗炎作用。还有文献报道SASP具有促进钠、水吸收的作用,减



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与SASP组比较: $\Delta P < 0.05$; 与GSPE组比较: $\blacktriangle P < 0.05$
 ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs SASP group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs GSPE group

图6 免疫组化分析联合用药对UC小鼠结肠组织中NF- κ B-p65、Nrf2、HO-1和Keap-1蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of combined administration on expression of NF- κ B-p65, Nrf2, HO-1, and Keap-1 proteins in colon tissue of mice with UC

轻腹泻症状,近期疗效佳^[19],但单独用药的整体疗效并不显著^[20]。

天然产物和中药治疗UC具有多环节、多层次、多靶点、疗效好等优势。本实验使用的GSPE主要成分为多酚类物质,具有较强的抗氧化作用。GSPE对大鼠UC急性阶段有明显的治疗作用,其作用机制可能是GSPE能抑制IKK的活化,阻断I κ B的磷酸化及降解,使NF- κ B失活,从而使NF- κ B表达减少,抑制了致炎因子的生成,阻断了炎症过程。GSPE可能激活了PKC或PKCa,促进细胞蛋白质合成、DNA合成以及细胞的生长分化,以促进大鼠UC组织损伤的修复^[20]。GSPE对DSS诱导的溃疡性小鼠有较好的治疗作用,可能是通过Nrf2/HO-1抗氧化通路和NF- κ B抗炎通路发挥治疗UC的作用^[10]。

本实验结果表明,GSPE组NF- κ B-p65蛋白表达比SASP组高,结肠组织及血清中细胞炎性因子

TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的含量比SASP组高,且具有显著性差异($P < 0.05$),可以看出SASP的抗炎作用要强于GSPE。而GSPE组Nrf2和HO-1蛋白表达比SASP组高,结肠组织及血清中SOD含量比SASP组高,MDA含量比SASP组低,具有统计学差异($P < 0.05$),结果表明GSPE的抗氧化作用比SASP强。

联合给药组NF- κ B-p65蛋白表达比GSPE、SASP单独给药组低($P < 0.05$),细胞炎性因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的含量较单独给药低($P < 0.05$);联合给药后Nrf2和HO-1蛋白表达比单独给药高($P < 0.05$),上调结肠组中SOD含量($P < 0.05$),下调MDA、NO含量($P < 0.05$),联合给药可以同时增强抗炎及抗氧化作用从而达到更好的抗溃疡作用,改善UC组织病理变化和疾病症状。

GSPE单独给药可以改善实验性UC小鼠的症状,但是弱于SASP的治疗效果,但是通过联合

SASP 给药,可以发挥其抗氧化的作用,治疗 UC 的疗效更为显著,且安全可靠。采用金氏 Q 值法对两药合用的实验数据进行分析对比, Q 值均大于 1.15,能达到协同增效的作用,对于指导临床用药具有很重要的意义。本研究结果也为拓展 GSPE 的临床应用提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [2] 张蕊. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜 ARE 结合活性与 HO-1 表达的变化 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
Zhang R. Changes of ARE binding activity and HO-1 expression in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.
- [3] Novak G, Hindryckx P, Khanna R, et al. The safety of vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(4): 501-507.
- [4] Koh S J, Kim J W, Kim B G, et al. Fexofenadine regulates nuclear factor- κ B signaling and endoplasmic Reticulum stress in intestinal epithelial cells and ameliorates acute and chronic colitis in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 352(3): 455-461.
- [5] 张勃, 汪晟坤, 连秀仪, 等. 夏黑葡萄花青素在 D-半乳糖致衰老小鼠心肌细胞抗氧化和清除自由基中的作用 [J]. *河南医学研究*, 2019, 28(20): 3649-3652.
Zhang Q, Wang S K, Lian X Y, et al. The antioxidant and free radical scavenging effects of Xiahei grape anthocyanin in myocardial cells of aging mice induced by D-galactose [J]. *Henan Med Res*, 2019, 28(20): 3649-3652.
- [6] 刘相菊, 高海青, 邱洁, 等. 葡萄籽原花青素对兔动脉粥样硬化氧化应激的影响 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2010, 48(8): 25-27, 31.
Liu X J, Gao H Q, Qiu J, et al. Oxidative effect of grape seed proanthocyanidin extract on atherosclerosis in rabbits [J]. *J Shandong Univ (Health Sci)*, 2010, 48(8): 25-27, 31.
- [7] 全帅, 吕开原, 李新宇, 等. 低聚葡萄籽原花青素对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎的影响及作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(1): 149-156.
Quan S, Lv K Y, Li X Y, et al. Effect of oligomeric grape seed proanthocyanidins on DSS-induced ulcerative colitis in mice and its mechanism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(1): 149-156.
- [8] Chu H, Tang Q, Huang H, et al. Grape-seed proanthocyanidins inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator expression in RAW_{264.7} macrophages by suppressing MAPK and NF- κ B signal pathways [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 41: 159-166.
- [9] LI W, ZHANG X, WU Y, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1117-1120.
- [10] Gulgun M, Erdem O, Oztas E, et al. Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2010, 62(2): 109-115.
- [11] Kim T H, Jeon E J, Cheung D Y, et al. Gastroprotective effects of grape seed proanthocyanidin extracts against nonsteroid anti-inflammatory drug-induced gastric injury in rats [J]. *Gut Liver*, 2013, 7(3): 282-289.
- [12] 耿福云. 5-ASA 与 SASP 治疗溃疡性结肠炎的临床疗效分析 [J]. *中外医学研究*, 2011, 9(27): 52-53.
Geng F Y. Clinical effect analysis of 5-ASA and SASP in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Chin For Med Res*, 2011, 9(27): 52-53.
- [13] 张磊, 王会丽. 柳氮磺胺吡啶联合中药灌肠在治疗溃疡性结肠炎的临床疗效 [J]. *中国合理用药探索*, 2019, 16(11): 163-165.
Zhang L, Wang H L. Clinical efficacy of sulfasalazine combined with traditional chinese medicine enema in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Chin J Rat Drug Use*, 2019, 16(11): 163-165.
- [14] 冯燕燕, 冯婷, 杨秉政. 柳氮磺胺吡啶对老年溃疡性结肠炎患者血清降钙素原、C 反应蛋白水平的影响 [J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(7): 24-28.
Feng Y Y, Feng T, Yang B Z, et al. Effect of sulfasalazine on serum procalcitonin and C-reactive protein levels in elderly patients with ulcerative colitis [J]. *J Clin Med Pract*, 2019, 23(7): 24-28.
- [15] Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 541-546.
- [16] 赵杰, 罗佳波, 方芳, 等. 麻黄-甘草药对利尿作用的定量评价 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(2): 14-15.
Zhao J, Luo J B, Fang F, et al. Quantitative evaluation of diuretic effect of Mahuang-Gancao pair [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2012, 28(2): 14-15.
- [17] 马清林, 杜丽东, 臧凯宏, 等. 溃疡性结肠炎研究进展概述 [J]. *医药论坛杂志*, 2020, 41(1): 175-177.
Ma Q L, Du L D, Zang K H, et al. Overview of research progress in ulcerative colitis [J]. *J Med Forum*, 2020, 41(1): 175-177.
- [18] Yu Q, Zhu S Y, Zhou R, et al. Effects of sinomenine on

- the expression of microRNA-155 in 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73757. doi: 10.1371/journal.pone.0073757.
- [19] 郑晗晗, 江学良. 美沙拉秦栓每日1次与每日2次给药治疗轻中度活动期溃疡性直肠炎的临床疗效比较 [J]. 中国全科医学, 2016, 19(11): 1267-1271.
- Zheng H H, Jiang X L. Comparison of clinical effect of mesalazine suppositories in the treatment of mild to moderate active stage ulcerative proctitis between once daily and twice daily [J]. Chin Gen Pract, 2016, 19(11): 1267-1271.
- [20] 梁晓芳, 孟妍忻, 李静. 柳氮磺吡啶栓联合中药保留灌肠治疗溃疡性直肠炎的临床观察 [J]. 辽宁医学院学报, 2015, 36(1): 24-26.
- Liang X F, Meng Y X, Li J. The curative effect of the therapy of sulfasalazine SASP combined with retention enema of traditional chinese medicine in the treatment of proctitis ulcerosa [J]. J Liaoning Med Univ, 2011, 9(27): 52-53.
- [21] Wang Y H, Yang X L, Wang L, et al. Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(9): 888-898.

[责任编辑 兰新新]