

• 实验研究 •

## 甘草酸对幼鼠实验性结肠炎的治疗作用及其机制研究

孙波, 李小芹\*, 周方

郑州大学附属儿童医院 消化内科, 河南 郑州 450000

**摘要:** 目的 探究甘草酸对幼鼠实验性结肠炎的治疗作用及其作用机制。方法 将75只SD大鼠幼鼠随机分为对照组、模型组、柳氮磺胺吡啶组(0.5 g/kg)和甘草酸40、160 mg/kg组, 每组各15只, 制备实验性结肠炎模型的同时分别灌肠给药, 连续7 d。观察大鼠一般情况, HE染色法观察大鼠结肠组织病理学变化并进行疾病活动指数(DAI)评分、黏膜损伤指数(CMDI)评定, 酶联免疫法测定血清中白介素-4(IL-4)、白介素-17(IL-17)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )水平, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western blotting法检测大鼠结肠组织中NLRP3、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶(caspase-1)表达。结果 与模型组比较, 甘草酸组幼鼠体质量逐渐增加, 症状改善; 炎症细胞浸润有所减少, 腺体破坏程度降低; DAI评分、CMDI评分均降低, 呈剂量相关性( $P < 0.05$ ); IL-4水平升高, IL-17、IL-1 $\beta$ 水平降低, 呈剂量相关性( $P < 0.05$ ); NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  mRNA表达和蛋白表达均降低, 呈剂量相关性( $P < 0.05$ )。结论 甘草酸能够治疗大鼠实验性结肠炎, 可能与抑制NLRP3通路蛋白表达、降低炎症因子水平有关。

**关键词:** 甘草酸; 实验性结肠炎; 疾病活动指数评分; 白介素-4; 凋亡相关斑点样蛋白; NLRP3通路; 作用机制

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)10-2471-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.10.001

## Therapeutic effect and its mechanism of glycyrrhizic acid on experimental colitis in rats

SUN Bo, LI Xiao-qin, ZHOU Fang

Department of Gastroenterology, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

**Abstract Objective** To explore the therapeutic effect of glycyrrhizin acid on experimental colitis in young rats and explain its mechanism. **Methods** Seventy-five SD young rats were randomly divided into normal group, model group, sulfasalazine group (0.5 g/kg), and glycyrrhizic acid groups (40 and 160mg/kg), and each group had 15 rats. The experimental colitis models were prepared and rats were enema administered with drugs for 7 d at the same time. The general situations of rats were observed, the pathological changes of colon tissues in rats were observed by HE staining, and the disease activity index (DAI) score and the colon mucosa damage index (CMDI) were evaluated. The levels of interleukin-4 (IL-4), interleukin-17 (IL-17), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in serum were measured by ELISA method, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting (WB) method were used to detect the expressions of NLRP3, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), apoptosis-related speckle shc-like protein (ASC), and caspase (caspase-1) in the colon tissues of rats. **Results** Compared with the model group, body weight gradually increased and symptoms improved in young rats of glycyrrhizic acid groups, and inflammatory cell infiltration and gland destruction were decreased. The DAI scores and the CMDI score in the glycyrrhizic acid groups were decreased, which positively relates to the dosage ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the levels of IL-4 in the glycyrrhizic acid groups were increased, and the levels of IL-17 and IL-1 $\beta$  were decreased in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the expressions of NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 $\beta$  mRNA and their protein expressions in the glycyrrhizin groups were decreased, and it was dose-dependent ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Glycyrrhizic acid can be used to treat experimental colitis in rats, which may be related to the inhibition of the expression of NLRP3 pathway protein and the levels of inflammatory factors.

**Key words:** glycyrrhizic acid; experimental colitis; DAI score; IL-4; ASC; NLRP3 pathway; mechanism

收稿日期: 2018-02-25

作者简介: 孙波(1984—), 男, 河南郑州人, 主治医师, 硕士, 主要从事小儿消化道疾病的基础与临床研究工作。E-mail: sunbo8419@163.com

\*通信作者 李小芹(1965—), 女, 河南焦作人, 主任医师, 硕士生导师, 从事小儿消化道疾病研究。E-mail: lixiaoqins@126.com

溃疡性结肠炎属于慢性炎症肠病,发病率较低,患者一般病程较长,治疗后反复发作,长久则会导致特发性血小板减少、布加综合征、强直性脊柱炎等,严重者则会发展为结肠癌<sup>[1]</sup>。临床治疗结肠炎的传统药物主要包括免疫抑制剂、激素、水杨酸等,但副作用较大,且停药后反复发作,因此临床应用受限<sup>[2]</sup>。甘草酸是甘草中活性成分,具有抗炎、免疫调节、抗肿瘤、抗氧化作用,用于溃疡性结肠炎的治疗<sup>[3]</sup>。复方甘草酸能够有效改善溃疡性结肠炎大鼠病变程度,减轻脂质过氧化反应<sup>[4]</sup>。本研究通过制备实验性结肠炎大鼠模型,给予甘草酸治疗,观察对结肠炎的疗效,探究甘草酸的作用机制。

## 1 实验材料

蛋白凝胶成像仪、CFX96PCR 仪购自于 Bio-Rad 公司; 80I 显微镜购自于日本 Nikon 公司; cx9 全自动生化测定仪购自于美国 Beckman 公司。

5%三硝基苯磺酸钠 (TNBS) 购自美国 Sigma 公司,质量分数 99%,批号 106k4216;使用时,取 TNBS 20 mL 溶于 50%乙醇溶液 20 mL 中,最终体积分数为 2.5%。甘草酸购自日本米诺发源制药株式会社,质量分数 98%,批号 J20150071。柳氮磺胺吡啶购自上海三维制药有限公司,质量分数 98.9%,批号 20150627。NLRP3 兔抗鼠单抗购自美国 Gibco 公司; ASC、IL-1 $\beta$ 、caspase-1 兔抗鼠单抗购自美国 R&D 公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 SantaCruz 公司; IL-4、IL-17、IL-1 $\beta$  Elisa 检测试剂盒均购自上海晶抗生物工程有限公司,批号分别为 JK-SJ-32269、JK-(a)-3509、JKSJ-2087,规格均为 48T; 伊红、苏木素染液购自美国 Sigma 公司; RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,批号 BTN3080; 逆转录试剂盒购自美国 Genecopoeia 公司,批号 K1622,规格 100 次; 2 $\times$ SYBR Premix 购自于宝生物工程公司; BCA 试剂盒购自于美国 Vector 公司,批号 23227。

清洁级 SPF 级幼年期 SD 大鼠 75 只 (5 周龄),雌雄各半,体质量为 100~140 g,由上海交通大学医学院实验动物科学部提供,幼鼠合格证号为 SYXK (沪) 2015-0006,所有幼鼠均在同一环境中饲养,温度为 25  $^{\circ}$ C,湿度为 70%,严格按照 SPF 级动物饲养要求进行饲养。

## 2 方法

### 2.1 实验性结肠炎模型制备

将幼鼠随机分为对照组、模型组、柳氮磺胺吡

啶组、甘草酸 40、160 mg/kg 组,每组各 15 只。模型制备方法参考文献<sup>[5]</sup>,即幼鼠均禁食 24 h,对照组幼鼠不进行处理,其余各组幼鼠用 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,将聚乙烯导管插进幼鼠结肠中,导管离肛门 8 cm 处,灌肠 2.5% TNBS 溶液 1 mL,随后将幼鼠倒置 1 min,第 2 天模型组灌肠生理盐水,连续 3 d; 柳氮磺胺吡啶组灌肠 0.5 g/kg 柳氮磺胺吡啶,连续 7 d; 甘草酸组分别灌肠 40、160 mg/kg 甘草酸<sup>[6]</sup>,连续 7 d。模型制备成功后,进行病理学检测,由资深病理科医师进行观察,并根据疾病活动指数 (Disease activity index, DAI) 评分和黏膜损伤指数 (Colonic mucosal damage index, CMDI) 进行评分,当模型组大鼠 DAI、CMDI 评分明显高于对照组,视为模型制备成功。

### 2.2 标本采集和处理

观察各组幼鼠每日精神状态、活动、粪便等情况,治疗各组幼鼠在灌肠第 8 天,于幼鼠腹腔抽取 2 mL 外周血,离心后取上清保存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中。随后幼鼠进行麻醉后处死,取幼鼠大肠结肠部位,放置于预冷生理盐水中,离肛门 1 cm 大肠剪取 0.5 cm 结肠,一部分置于 4%多聚甲醛溶液中,另一部分保存在 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中。

### 2.3 HE 染色法观察结肠组织病理学变化

制备结肠组织石蜡切片,在二甲苯中固定 30 min,随后在 100%、95%、85%、75%乙醇溶液中分别脱水 5 min; 蒸馏水冲洗后,加入苏木素染色 10 min,随后置于 1%盐酸 5 s 后,蒸馏水进行冲洗。滴加伊红染液进行复染 5 min,在不同体积分数的乙醇溶液中脱水 2 min,加入二甲苯进行透明处理,滴加中性树脂封片,置光学显微镜下进行观察。

### 2.4 大鼠 DAI、CMDI 评定标准

参照 Hamamoto 等标准<sup>[7]</sup>: 动物体质量不变为 0,下降 1%~5%为 1 分,5%~10%为 2 分,10%~15%为 3 分,大于 15%为 4 分; 大便黏稠度: 正常为 0,松散为 2 分,腹泻为 4 分; 大便出血: 正常为 0,隐血阳性为 2 分,显性出血为 4 分,3 种情况进行综合评分,DAI=(体质量指数+大便形状+出血情况)/3。

CMDI 评分标准<sup>[8]</sup>: 结肠无损为 0 分; 结肠表面光滑,未出现糜烂,出现轻度充血、水肿为 1 分; 结肠黏膜无溃疡,出现轻、中度充血、水肿、糜烂为 2 分; 结肠黏膜表面出现坏死、黏膜高度充血水肿,出现溃疡,肠壁表面增厚为 3 分; 在 3 分基础

上, 溃疡面积增大, 或全部肠壁均出现坏死为 4 分。

### 2.5 血清中 IL-4、IL-17、IL-1 $\beta$ 水平变化

采用 Elisa 法检测幼鼠血清中 IL-4、IL-17、IL-1 $\beta$  水平变化, 具体方法参照试剂盒操作说明进行。

### 2.6 结肠组织中 NLRP3、ASC、IL-1 $\beta$ 、caspase-1 的 RT-PCR 法检测

参照 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用逆转录

试剂盒反转录为 cDNA, RT-PCR 引物序列见下表 1。反应体系为 20  $\mu$ L: 2 $\times$ SYBR Mix 10  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ cDNA 模板 1  $\mu$ L。反应条件设定为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s、60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 40 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 GAPDH 作为内参基因根据 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 算法进行各组 mRNA 表达量分析。

表 1 RT-PCR 引物序列  
Table 1 RT-PCR primer sequence

| 引物名称         | 方向 | 序列 (5'-3')            | 引物长度/bp |
|--------------|----|-----------------------|---------|
| NLRP3        | F  | ATTACCCGCCCGACAATAGG  | 139     |
|              | R  | CATGAGTCAGCTAGGCTAGAA |         |
| ASC          | F  | GATGCTCTGTACGGGAAGGTC | 116     |
|              | R  | TCCAGTTCCAGGCTGGTGT   |         |
| caspase-1    | F  | TAGCAGAGTCGGTAAGACATG | 122     |
|              | R  | GGGGCTTCTTTGAAGGCACAT |         |
| IL-1 $\beta$ | F  | TGCATGCTCTCGCTAGGACAG | 119     |
|              | R  | TAGTGGTGGTCGGAGATT    |         |
| GAPDH        | F  | TGTGTCCGTCGTGGATCTGA  | 130     |
|              | R  | TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG |         |

### 2.7 结肠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$ 的 Western blotting 法检测

取出冰冻大肠组织, 冰上融化后剪碎, 添加蛋白裂解液置于冰上反应 30 min, 离心后收集上清液, BCA 试剂盒测定蛋白总浓度, 配制 10%分离胶、5%浓缩胶, 取 30  $\mu$ g 蛋白上样, 待蛋白样品刚进入浓缩胶时电压设置为 80 V, 进入分离胶后, 电压升高至 120 V。电泳结束后, 将目的条带凝胶切除转移到 PVDF 膜上, 冰上进行转膜反应, 电压为 100 V, 转膜 1 h, 结束后用 TBST 溶液清洗, 加入 5%脱脂牛奶室温下进行 1 h 封闭, TBST 溶液清洗后, 加入一抗 (NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  抗体, 稀释倍数 1:500), 4  $^{\circ}$ C 过夜, TBST 后加入羊抗鼠 IgG 二抗 (稀释倍数 1:10 000), 室温下孵育 2 h, TBST 清洗后 ECL 显色后置于凝胶成像仪中观察各组蛋白表达情况。

### 2.8 统计学分析

本研究所得数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计, 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 一般情况

模型组幼鼠灌肠后第 2 天毛发凌乱、无光泽, 精神萎靡, 进食量减少, 体质量减轻, 出现腹泻稀便、水样便, 随后肛门周围出现血便; 甘草酸组、柳氮磺胺吡啶组幼鼠体质量逐渐增加, 与模型组比较, 症状改善; 对照组幼鼠无明显异常。

### 3.2 结肠组织形态学观察

对照组幼鼠结肠正常, 黏膜下层、固有层均未出现炎性细胞浸润; 模型组结肠组织黏膜下层出现大量炎性细胞浸润, 溃疡面积较大, 数量较多, 腺体遭到破坏; 甘草酸 40 mg/kg 组炎症细胞浸润有所减少, 腺体破坏程度降低, 比模型组有所改善; 柳氮磺胺吡啶组、甘草酸 160 mg/kg 组黏膜下层出现少量炎性细胞浸润、腺体增生, 溃疡面积明显减少。见图 1。

与对照组比较, 模型组 DAI 评分、CMDI 评分均升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 甘草酸组 DAI 评分、CMDI 评分均降低 ( $P<0.05$ ), 呈剂量相关性。见表 2。

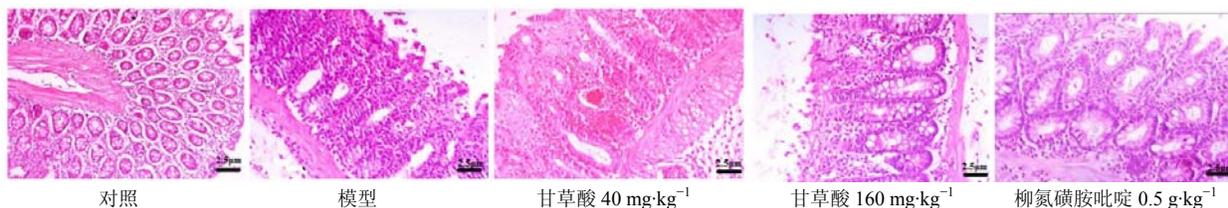


图 1 幼鼠结肠组织病理学检测 (HE 染色)

Fig. 1 Pathological examination of colonic tissue in young rats (HE staining)

表 2 各组幼鼠 DAI、CMDI 评分比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 2 Comparison on DAI and CMDI scores in young rats ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别     | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | DAI 评分                   | CMDI 评分                  |
|--------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照     | —                             | 0                        | 0                        |
| 模型     | —                             | 7.68 ± 0.79*             | 2.66 ± 0.54*             |
| 柳氮磺胺吡啶 | 500                           | 5.74 ± 0.71 <sup>#</sup> | 1.75 ± 0.36 <sup>#</sup> |
| 甘草酸    | 40                            | 6.83 ± 0.87 <sup>#</sup> | 1.92 ± 0.37 <sup>#</sup> |
|        | 160                           | 6.12 ± 0.55 <sup>#</sup> | 1.79 ± 0.43 <sup>#</sup> |

与对照组比较: \*P<0.05; 与模型组比较: <sup>#</sup>P<0.05

\*P<0.05 vs control group; <sup>#</sup>P<0.05 vs model group

### 3.3 IL-4、IL-17、IL-1β 血清水平检测

与对照组比较, 模型组血清 IL-4 水平降低, IL-17、IL-1β 水平升高 (P<0.05); 与模型组比较,

甘草酸组 IL-4 水平升高, IL-17、IL-1β 水平降低 (P<0.05), 呈剂量相关性。见表 3。

### 3.4 结肠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β 的 RT-PCR 法检测

与对照组比较, 模型组 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β mRNA 表达均升高 (P<0.05); 与模型组比较, 甘草酸组 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β mRNA 表达均降低 (P<0.05), 呈剂量相关性。见表 4。

### 3.5 结肠组织中 NLRP3、ASC、IL-1β、caspase-1 的 Western blotting 法检测

与对照组比较, 模型组 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β 蛋白表达均升高 (P<0.05); 与模型组比较, 甘草酸组 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β 蛋白表达均降低 (P<0.05), 呈剂量相关性。见表 5。

表 3 各组幼鼠血清 IL-4、IL-17、IL-1β 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 3 Comparison on serum IL-4, IL-17, and IL-1β levels in young rats ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别     | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | IL-4/(ng·L <sup>-1</sup> ) | IL-17/(ng·L <sup>-1</sup> ) | IL-1β/(ng·L <sup>-1</sup> ) |
|--------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 对照     | —                         | 92.67 ± 7.43               | 134.51 ± 23.44              | 82.34 ± 16.28               |
| 模型     | —                         | 76.53 ± 6.29*              | 171.54 ± 22.3*              | 140.27 ± 17.59*             |
| 柳氮磺胺吡啶 | 500                       | 89.26 ± 7.34 <sup>#</sup>  | 141.21 ± 19.45 <sup>#</sup> | 88.49 ± 12.03 <sup>#</sup>  |
| 甘草酸    | 40                        | 81.24 ± 7.84 <sup>#</sup>  | 154.73 ± 19.67 <sup>#</sup> | 121.65 ± 18.67 <sup>#</sup> |
|        | 160                       | 87.63 ± 8.57 <sup>#</sup>  | 148.35 ± 21.66 <sup>#</sup> | 103.77 ± 13.78 <sup>#</sup> |

与对照组比较: \*P<0.05; 与模型组比较: <sup>#</sup>P<0.05

\*P<0.05 vs control group; <sup>#</sup>P<0.05 vs model group

表 4 各组幼鼠 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 4 Expression of NLRP3, ASC, caspase-1, and IL-1β mRNA in young rats ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别     | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | NLRP3/GAPDH              | ASC/GAPDH                | caspase-1/GAPDH          | IL-1β/GAPDH              |
|--------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照     | —                         | 0.18 ± 0.03              | 0.13 ± 0.04              | 0.17 ± 0.03              | 0.19 ± 0.05              |
| 模型     | —                         | 1.19 ± 0.06*             | 1.46 ± 0.38*             | 1.25 ± 0.16*             | 1.23 ± 0.15*             |
| 柳氮磺胺吡啶 | 500                       | 0.61 ± 0.08 <sup>#</sup> | 0.53 ± 0.07 <sup>#</sup> | 0.61 ± 0.03 <sup>#</sup> | 0.68 ± 0.07 <sup>#</sup> |
| 甘草酸    | 40                        | 0.92 ± 0.15 <sup>#</sup> | 1.12 ± 0.26 <sup>#</sup> | 0.98 ± 0.09 <sup>#</sup> | 0.94 ± 0.11 <sup>#</sup> |
|        | 160                       | 0.78 ± 0.12 <sup>#</sup> | 0.78 ± 0.13 <sup>#</sup> | 0.64 ± 0.16 <sup>#</sup> | 0.76 ± 0.09 <sup>#</sup> |

与对照组比较: \*P<0.05; 与模型组比较: <sup>#</sup>P<0.05

\*P<0.05 vs control group; <sup>#</sup>P<0.05 vs model group

表5 各组幼鼠 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
 Table 5 Expression of NLRP3, ASC, caspase-1, and IL-1 $\beta$  protein in young rats ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别     | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | NLRP3                    | ASC                      | caspase-1                | IL-1 $\beta$             |
|--------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照     | —                         | 0.22 ± 0.04              | 0.14 ± 0.03              | 0.17 ± 0.03              | 0.19 ± 0.05              |
| 模型     | —                         | 1.33 ± 0.12*             | 0.98 ± 0.18*             | 1.55 ± 0.36*             | 0.93 ± 0.08*             |
| 柳氮磺胺吡啶 | 500                       | 0.51 ± 0.7 <sup>#</sup>  | 0.43 ± 0.08 <sup>#</sup> | 0.63 ± 0.05 <sup>#</sup> | 0.41 ± 0.08 <sup>#</sup> |
| 甘草酸    | 40                        | 1.01 ± 0.14 <sup>#</sup> | 0.82 ± 0.09 <sup>#</sup> | 1.08 ± 0.23 <sup>#</sup> | 0.74 ± 0.07 <sup>#</sup> |
|        | 160                       | 0.58 ± 0.06 <sup>#</sup> | 0.48 ± 0.13 <sup>#</sup> | 0.74 ± 0.16 <sup>#</sup> | 0.46 ± 0.09 <sup>#</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$   
 \* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group

#### 4 讨论

结肠炎发病机制较复杂, 较多研究认为消化道黏膜免疫功能失调与之密切相关。机体在药物、毒素、感染等因素影响下破坏结肠上皮屏障, 使其暴露在肠抗原中, 引发黏膜免疫反应, 由于机体免疫功能发生异常, 因此炎症反应也随之扩大, 最终引发结肠组织损伤。西医治疗虽能够一定程度上缓解临床症状, 但并不能预防结肠炎的复发, 且药物副作用较大, 因此寻找合适的药物治疗结肠炎是目前临床的重要任务。大量临床研究显示甘草酸治疗结肠炎效果较好, 且能降低患者复发率<sup>[9]</sup>。但目前其作用机制尚不清楚, 本研究通过制备结肠炎幼鼠, 给予甘草酸治疗, 以探究其可能的作用机制。

文献报道 T 辅助细胞亚群 (Th) 中较多炎症因子均参与结肠炎的发生, Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-17、IL-1 $\beta$  等炎症因子均为肠黏膜损伤的介质, 发挥促炎症作用, IL-4 主要调控巨噬细胞、淋巴细胞免疫作用<sup>[10]</sup>。张文志等<sup>[11]</sup>研究显示, 结肠炎患者结肠黏膜中 IL-4 表达低于对照组, 血清 IL-4 水平降低, 且随着水平的降低, 炎症反应作用增强。IL-1 $\beta$  由单核巨噬细胞分泌, 是介导结肠炎的细胞因子之一, 能够对中性粒细胞产生趋化作用, 使其进入肠道病变部位, 引发小血管炎、结肠上皮损伤、隐窝脓肿等, 最终导致结肠炎的发病<sup>[12]</sup>。本研究测定各组幼鼠血清中 IL-4、IL-17、IL-1 $\beta$  水平, 结果显示模型组 IL-17、IL-1 $\beta$  水平升高, IL-4 水平降低, 说明 IL-4、IL-17、IL-1 $\beta$  与结肠炎的发生有关。甘草酸化学结构与皮质激素类似, 具有抗过敏、抗炎功效, 通过参与花生四烯酸代谢途径, 直接结合启动酶磷脂酶 A、脂氧合酶结合, 抑制酶的磷酸化而降低酶活, 进而抑制炎症介质的产生<sup>[13-14]</sup>。本研究给予甘草酸治疗后, 幼鼠 IL-4 水平升高, IL-17、IL-1 $\beta$  水平降低, 表明甘草酸能够促进 IL-4 因子的释放,

抑制 IL-17、IL-1 $\beta$  产生, 进而发挥其抗炎作用。

NALP3 炎性体是机体内识别免疫系统病原体的重要蛋白, 大量研究显示其能够在 ATP、病毒、尿酸钠诱导下激活 NALP3 炎性小体, 促进其 C 端结构 LRR 与配体结合, 进而改变 NALP3 结构, 暴露中部 NACHT 结构域, 在 ATP 作用下形成 NALP3 蛋白复合体, 继而促进 ASC、caspase-1 集合形成复合物活化 caspase-1, caspase-1 发生活化后使 IL-1 $\beta$  前体天冬氨酸裂解, 促使 IL-1 $\beta$  成熟并分泌细胞外引发炎症反应, 进而在多个系统、器官中发挥致病作用<sup>[15-16]</sup>。近期多项研究均证实 NLRP3 炎性体通路参与结肠炎的发生。Guo 等<sup>[17]</sup>研究显示 NLRP3 炎性小体发生活化后能够使 IL-1 $\beta$  水平升高, 提高结肠炎易感性。动物模型研究显示, 模型组幼鼠结肠黏膜中 NLRP3 水平明显高于对照组<sup>[18]</sup>。Zaki 等<sup>[19]</sup>通过对 NLRP3 炎性通路中 NLRP3、ASC、caspase-1 基因缺陷小鼠研究显示此类幼鼠能够抑制葡聚糖硫酸钠诱导急性肠炎的发生。而另有学者采用 IL-1 $\beta$  siRNA 与 caspase-1 抑制剂则能够明显改善幼鼠结肠炎<sup>[20-21]</sup>。以上结果均提示 NLRP3 通路与结肠炎的发生密切相关。甘草酸是否通过 NLRP3 炎性体来发挥对结肠炎的治疗作用, 目前尚不清楚。本研究显示模型组幼鼠结肠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  水平均升高, 表明 NLRP3 通路与结肠炎的发生有关。给予甘草酸治疗后 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  水平降低, 且具有剂量相关性, 表明甘草酸能够抑制 NLRP3 通路蛋白活性, 进而发挥其抗炎作用。

综上所述, NLRP3 通路与结肠炎的发生有关, 甘草酸能够抑制 NLRP3 通路蛋白活性, 减轻炎症反应, 进而改善结肠炎症状。本研究还存在一定的局限性, 炎症通路除了 NLRP3 炎性体信号通路外, 还有 TLRs/NF- $\kappa$ B 等信号通路, 甘草酸治疗结肠炎

是否还需要通过其他途径发挥作用, 还有待后续深入研究。

#### 参考文献

- [1] 何玉环, 高峰, 卢加杰, 等. 新疆地区溃疡性结肠炎发病的相关危险因素分析 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(18): 3070-3073.
- [2] 陈曦, 田耀州, 夏军权. 溃疡性结肠炎治疗研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(3): 293-296.
- [3] 刘春生, 刘颖. 药用植物功能基因的研究思路与展望—以甘草为例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 1-6.
- [4] 司徒绮仪, 刘国栋, 杜子明, 等. 复方甘草酸苷抗大鼠溃疡性结肠炎作用机制的研究 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(21): 24-26.
- [5] 钦丹萍, 孙佩娜, 周毅骏, 等. 雷公藤多苷对溃疡性结肠炎大鼠模型炎症及 TLR4/MyD88 信号通路的作用 [J]. 中华医学杂志, 2016, 96(18): 1444-1449.
- [6] 吕飞, 卢光新, 杜勇. 复方甘草酸苷对实验性溃疡性结肠炎大鼠白细胞介素 4、白细胞介素 17 水平的影响 [J]. 临床荟萃, 2013, 28(2): 178-180.
- [7] Hamamoto N, Maemura K, Hirata I, *et al.* Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice by intracolonicly administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)) [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 117(3): 462-468.
- [8] Millar A D, Rampton D S, Chander C L, *et al.* Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis [J]. *Gut*, 1996, 39(3): 407-415.
- [9] 杜岩. 复方甘草酸苷注射液联合复方谷氨酰胺肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(9): 1675-1678.
- [10] 王程玉林, 孙军刚, 耿煜, 等. Treg/Th17 平衡轴在溃疡性结肠炎发病中的意义及流式细胞术检测进展 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(6): 541-544.
- [11] 张文志, 欧水平, 吴会超, 等. 芦荟多糖对实验性结肠炎大鼠肠黏膜的保护作用及其机制研究 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(3): 352-355.
- [12] 周天羽, 周博, 王俊江, 等. 清肠愈疡汤对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-1 $\beta$  及 IL-6 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 849-851.
- [13] 杨飞, 吴德康, 陈丽红, 等. 葛根芩连汤中葛根素、黄芩苷、小檗碱与甘草酸组合在大鼠体内代谢产物研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 164-168.
- [14] 侯绍章, 张婷, 李媛, 等. 甘草酸对高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激损伤的影响 [J]. 重庆医学, 2017, 46(27): 3745-3747.
- [15] 覃景春, 钱彩云, 揭凤鸣, 等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠肠道 NLRP3 炎性体的调控研究 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 46-49.
- [16] Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy M R, *et al.* The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation [J]. *Cell*, 2013, 153(2): 348-361.
- [17] Guo W, Liu W, Jin B, *et al.* Asiatic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via suppressing mitochondria-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 232-238.
- [18] Mak'Anyengo R, Dueueil P, Lehr H A, *et al.* Balance of NLRP3-mediated IL-1 $\beta$  and IL-18 signaling regulates colitis induction in a T cell transfer model of inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5): 615-620.
- [19] Zaki M H, Boyd K L, Vogel P, *et al.* The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis [J]. *Immunity*, 2010, 32(3): 379-391.
- [20] Coll R C, Robertson A, Butler M, *et al.* The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29539.
- [21] Li L, Liu Z, Yang X, *et al.* Bioluminescence imaging for IL-1 $\beta$  expression in experimental colitis [J]. *J Inflamm (Lond)*. 2013, 10(1): 16-20.