

## 雷公藤多苷片对溃疡性结肠炎大鼠 miR-146a、miR-146b 及 TLR4/MyD88 依赖信号通路的调控作用研究

周毅骏<sup>2</sup>, 钦丹萍<sup>1,2\*</sup>, 杨新艳<sup>2</sup>, 杨雪静<sup>3</sup>, 张春丽<sup>4</sup>, 曹俊敏<sup>3</sup>, 李艳平<sup>3</sup>, 李珊<sup>2</sup>

1. 浙江中医药大学附属第一医院 消化内科, 浙江 杭州 310006
2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053
3. 浙江中医药大学附属第一医院 中心实验室, 浙江 杭州 310006
4. 浙江中医药大学附属第一医院 病理科, 浙江 杭州 310006

**摘要:** 目的 研究雷公藤多苷片(TWPT)对2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇溃疡性结肠炎(UC)大鼠微小RNA(miR-146a、miR-146b)及TLR4/MyD88依赖信号通路的调控作用。方法 采用TNBS/乙醇灌肠法制备UC大鼠模型。将90只雄性Wistar大鼠随机分为对照组,模型组,TWPT低、中、高剂量(30、60、120 mg/kg)组,硫唑嘌呤(AZA, 60 mg/kg)组,每组15只。各组分别ig给予相应药物连续14 d。进行各组大鼠结肠组织大体及镜下病理评分。采用qRT-PCR法检测miR-146a和miR-146b的表达情况;Western blotting法和RT-PCR法检测大鼠结肠组织中TLR4/MyD88依赖信号通路相关分子(TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )在mRNA及蛋白水平的表达情况。结果 DAI评分,大体及镜下表现和评分均提示TNBS/乙醇UC大鼠模型造模成功,TWPT对UC大鼠临床症状的改善及黏膜愈合具有一定作用,该作用与AZA相比相当或强于AZA。qRT-PCR结果提示:与对照组相比,模型组中miR-146a和miR-146b表达明显增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,TWPT及AZA均可显著抑制miR-146a和miR-146b的表达( $P < 0.01$ ),其中TWPT中剂量组对2者的抑制作用最强。RT-PCR及Western blotting实验均提示:与对照组相比,模型组中TLR4/MyD88依赖信号通路相关的分子无论在mRNA还是蛋白水平表达均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,TWPT呈剂量依赖性地抑制该信号通路上各节点分子mRNA及蛋白水平的表达,其中TWPT高剂量组中各节点分子mRNA及蛋白表达水平低于模型组( $P < 0.05$ )。与AZA组比较,TWPT高剂量组对该信号通路上游因子(TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B)mRNA及蛋白表达水平的抑制作用略好于AZA组,而对末端炎症因子TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$  mRNA及蛋白水平的抑制作用却略逊于AZA组,但上述2种差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 在TNBS/乙醇UC大鼠模型中,TWPT能通过抑制miR-146a和miR-146b的表达,并能抑制TLR4/MyD88依赖信号通路及炎症因子IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 释放,对信号通路及炎症因子的作用强度与剂量呈正相关。

**关键词:** 雷公藤多苷片; 溃疡性结肠炎; miR-146a; miR-146b; TLR4/MyD88 依赖信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)10-1723-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.10.016

## Regulation of *Tripterygium wilfordii* Polycoride Tablet towards miR-146a, miR-146b, and TLR4/MyD88 dependent signaling pathway in ulcerative colitis rat model

ZHOU Yi-jun<sup>2</sup>, QIN Dan-ping<sup>1,2</sup>, YANG Xin-yan<sup>2</sup>, YANG Xue-jing<sup>3</sup>, ZHANG Chun-li<sup>4</sup>, CAO Jun-min<sup>3</sup>, LI Yan-ping<sup>3</sup>, LI Shan<sup>2</sup>

1. Department of Digestion, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China
2. First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
3. Central Laboratory, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China
4. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China

**Abstract: Objective** To study the regulatory effect of *Tripterygium wilfordii* Polycoride Tablet (TWPT) towards miR-146a, miR-146b, and TLR4/MyD88 dependent signaling pathway in TNBS/ethanol ulcerative colitis (UC) rat model. **Methods** TNBS enema was adopted to build TNBS/ethanol UC rat model. After the modeling procedure, 90 male Wistar rats were divided into six

收稿日期: 2015-10-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273903)

\*通信作者 钦丹萍,男,主任医师,教授,研究方向为消化免疫学。Tel: 13606805004 E-mail: qindp19841@sina.com

groups, including normal, model, low-, mid-, high-dose TWPT, and azathioprine (AZA) groups, and each for 15 rats. All rats in each group were administered with corresponding medicines for 14 d. After 14 d administration, corresponding colon tissues were taken to undergo general and microscopic evaluation. qPCR was adopted to test the expression of miR-146a and miR-146b. Western blotting analysis and RT-PCR were adopted to test the mRNA and protein expression levels of TLR4/MyD88 dependent signaling pathway related molecular, including TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . **Results** DAI, general and microscopic evaluation all showed that TNBS/ethanol UC rat model was successfully established. TWPT could improve UC-related clinical manifestation and promote the colonic mucosa healing procedure and such effect was equal to AZA. qRT-PCR showed that the expression of miR-146a and miR-146b in model group was significantly superior to that in normal group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, TWPT and AZA could significantly inhibit the expression of miR-146a and miR-146b ( $P < 0.01$ ). The mid-dose TWPT showed the strongest inhibitory effect. RT-PCR and Western blotting results showed that the expression of TLR4/MyD88 dependent signaling pathway related molecular in model group was significantly superior to that in normal group either in mRNA or protein levels ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, TWPT could inhibit the expression of each spot in TLR4/MyD88 dependent signaling pathway in a dose-dependent manner. The inhibitory effect of high-dose TWPT towards the above molecular was superior to that in model group either in mRNA or protein levels ( $P < 0.05$ ). The inhibitory effect of high-dose TWPT towards upstream molecular of TLR4/MyD88 dependent signaling pathway (TLR4/MyD88/TRAF-6/NF- $\kappa$ B) was slightly superior to that in AZA group either in mRNA or protein levels. However, such inhibitory effect towards terminal inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) was slightly inferior to that in AZA group either in mRNA or protein levels. All the above differences had no statistical significance ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** In TNBS/ethanol UC rat model, TWPT could inhibit the expression of miR-146a, miR-146b, and TLR4/MyD88 dependent signaling pathway. The inhibitory effect of TWPT towards pathway and inflammatory cytokines shows a dose-dependent manner.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii* Polycoride Tablet; ulcerative colitis; miR-146a; miR-146b; TLR4/MyD88 dependent signaling pathway

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的一种类型, 其发病与自身免疫异常相关<sup>[1]</sup>。目前的治疗以氨基水杨酸、类固醇激素与免疫抑制剂 3 类药物为主<sup>[2-3]</sup>, 但是无法有效的防治, 不可长期使用。近年来, 大量研究以中药复方、单味药或者活性成分为研究对象, 以期开发出治疗、预防溃疡性结肠炎的新型药物。雷公藤多苷片 (*Tripterygium wilfordii* Polycoride Tablet, TWPT) 是以雷公藤多苷为主要成分的口服制剂, 临床上发现其具有免疫调控及抗炎作用, 被应用于治疗一些自身免疫性疾病<sup>[4-5]</sup>, 但其对 UC 的作用及作用机制至今尚未明确。

目前对于 TLR4/MyD88 依赖信号通路在 UC 发病中的地位已得到重视<sup>[6]</sup>, 既往文献提示微小 RNA (miR-146a 和 miR-146b) 与该信号通路密切相关, 参与调控肠道内的炎症反应<sup>[7]</sup>。因此, 本实验尝试通过 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) /乙醇诱导 UC 大鼠模型作为研究对象, 观察 TWPT 的抗炎作用, 并通过检测 miR-146a、miR-146b 及 TLR4/MyD88 依赖信号通路的表达情况来探讨 TWPT 的抗炎作用机制, 为 TWPT 治疗 UC 提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体质量 (200 ± 20) g, 动物合格证号 2007000556038, 由浙江中医

药大学动物中心提供, 常规饲养。

### 1.2 药物

TWPT (浙江德恩制药有限公司生产, 批号 1311108B, 每克雷公藤多苷片原料粉中含有 4.17 mg 雷公藤内酯甲、0.176 mg 雷公藤甲素); 硫唑嘌呤片 (AZA, 上海医药集团有限公司信谊制药总厂生产, 批号 008953)。

### 1.3 试剂与仪器

5% TNBS (Sigma 公司); 10%水合氯醛 (浙江省中医院); 无水乙醇 (杭州龙山精细化工有限公司); 中心静脉导管 (上海景年医疗器械有限公司); miR-146a、miR-146b 引物 (上海伯豪生物技术有限公司设计); Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6)、核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) PCR 引物由 Takara 公司合成;  $\beta$ -actin、NF- $\kappa$ B 抗体 (Cell Signaling Technology); TLR4 抗体、MyD88 抗体、TRAF-6 抗体、IL-1 $\beta$  抗体 (Abcam); TNF- $\alpha$  抗体 (R&D); 兔二抗; 羊二抗; 电泳仪及电泳槽 (Bio-rad); RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒 (Takara, Shiga, 日本); PCR 扩增仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, 美国)。

## 2 方法

### 2.1 分组

将 90 只健康 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 分别

为对照组, 模型组, TWPT 低、中、高剂量 (30、60、120 mg/kg) 组, AZA 阳性对照组, 每组 15 只。

## 2.2 模型制备

大鼠适应性喂养 1 周, 使体质量达到 (200±20) g, 禁食 24 h。10% 水合氯醛 3 mL/kg ip 麻醉后, 将石蜡油润滑过的深静脉置管由肛门缓慢插入结肠约 8 cm 处, 模型组和药物组按每只大鼠 0.02 mL/kg 5% TNBS+0.25 mL 50% 乙醇进行灌肠, 对照组按 0.02 mL/kg 生理盐水+0.25 mL 生理盐水进行灌肠, 灌肠结束加推 0.3 mL 空气, 用棉签堵住大鼠肛门, 轻揉大鼠腹部 1 min 并倒置 5 min, 造模结束后将大鼠平放, 自然清醒后常规饮食。3 d 后评价模型成功与否, 具体造模成功标准: 造模后 2 d 内大鼠出现精神倦怠甚至萎靡、懒动、进食明显减少, 嗜卧伴消瘦、毛发脏乱、失去光泽, 腹泻, 大便次数增多, 肛周皮毛污秽黏腻, 粪便稀烂及血便。

## 2.3 给药

对照组、模型组 ig 给予 0.1 mL/kg 生理盐水; AZA 组: 将 AZA 研成细末, 在细末中加生理盐水制成混悬液, 按大鼠 AZA 60 mg/kg 的剂量 ig 给药; TWPT 低、中、高剂量组: 将 TWPT 研成细末, 在细末中加生理盐水制成混悬液, 分别按 30、60、120 mg/kg 的剂量分别 ig 给药。以上药物在造模 3 d 后开始给药, 每天 1 次, 连续给药 14 d。

## 2.4 观察项目

每日观察大鼠体质量、毛发、饮食、大便等一般情况, 并进行隐血试验及疾病活动指数 (DAI) 评分<sup>[6]</sup>。

## 2.5 标本采集

末次给药 24 h 后, 各组随机取 11 只大鼠处死, 留取距肛门 8 cm、前后各多保留 0.5 cm 的结肠组织进行相关检测。每组其余 4 只大鼠进行高通量测序。

## 2.6 观察指标及检测方法

**2.6.1 结肠炎症评价** ① DAI 评分: 按照 Fitzpatrick 等<sup>[8]</sup>提出的标准, 通过结合给药 14 d 后大鼠体质量下降百分率、大便性状及大便隐血情况进行评分; ② 大体形态损伤评分: 参照 Wallace 等<sup>[9]</sup>提出的标准进行评分; ③ 镜下结肠损伤评分: 取病变组织进行 HE 染色, 按照 Geboes 等<sup>[10]</sup>提出的评分标准进行评分。

**2.6.2 qRT-PCR 法测定 miR-146a 及 miR-146b 的表达情况** 按 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA,

紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 重复测定 3 次, 取 500 ng RNA 按反转录试剂盒说明书 (QIAGEN, 美国) 进行逆转录反应合成 cDNA, 用 ABI 7500 PCR 仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, 美国) 按 RT-PCR 说明书将 cDNA 进行 PCR 扩增, 以 U6 为内参, 以 95 °C 预变性 30 s, 然后进行循环扩增, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火加延伸 30 s, 共 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析。miRNA 的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的形式表示。miR-146a 及 miR-146b 的引物由上海伯豪生物技术有限公司设计。miR-146a、miR-146b 引物序列见表 1。

表 1 miR-146a 和 miR-146b 引物序列

Table 1 Primer sequences for miR-146a and miR-146b

引物	引物序列 (5'→3')
U6 (内参)	TTCGTGAAGCGTTCATATTTT
rno-miR-146a-5p	TGAGAACTGAATTCATGGGTT
rno-miR-146b-5p	TGAGAACTGAATTCATAGGCTG

**2.6.3 RT-PCR 法测定 TLR4/MyD88 信号通路相关分子 mRNA 表达水平** 所取标本按 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 重复测定 3 次, 取 500 ng RNA 按反转录试剂盒说明书进行逆转录反应合成 cDNA, 用 ABI 7500 PCR 仪按 RT-PCR 说明书将 cDNA 进行 PCR 扩增, 以  $\beta$ -actin 为内参, 以 95 °C 预变性 30 s, 然后进行循环扩增, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火加延伸 30 s, 共 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析目的基因的相对表达水平。各信号 mRNA 分子引物情况见表 2。

**2.6.4 Western blotting 法测定 TLR4/MyD88 信号通路相关蛋白表达水平** 将所取肠组织标本研磨粉碎后, 加入 6 倍量冷蛋白裂解液 [20 mmol/L Tris/HCl (pH 7.5), 10 mmol/L APMSF, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT] 制成缓冲液。取一定量蛋白上样, 于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 分离的蛋白质转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶封闭 2 h, 加入 TLR4 (1:500)、MyD88 (1:1000)、TRAF-6 (1:500)、NF- $\kappa$ B (1:1000)、TNF- $\alpha$  (1:5000)、IL-1 $\beta$  (1:2500) 单克隆抗体, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 5 min×3 次。分别加入相应荧光二抗 (1:15000), 室温缓慢震荡 2 h, TBST 洗膜 5 min×3 次。采用 Odyssey 曝光机进行图像显影, Odyssey 软件进行图像数据分析, 目的蛋白的表达值为目的蛋白的灰度值与  $\beta$ -actin 灰度值的比值。

表 2 各信号分子引物情况

Table 2 Primers for each signaling molecules

信号蛋白	上游引物	下游引物
β-actin	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'
TLR4	5'-CTCACAACCTCAGTGGCTGGATTTA-3'	5'-GTCTCCACAGCCACCAGATTCTC-3'
MyD88	5'-TATACCAACCCCTTGACCAAGTC-3'	5'-TCAGGCTCCAAGTCAGCTCATC-3'
TRAF-6	5'-TTTGGCGTCGGAGACACTTG-3'	5'-TCGCTTGAAGACTGGCTGGA-3'
NF-κB	5'-CATGCGTTTCCGTTACAAGTG-3'	5'-GTGCGTCTTAGTGGTATCTGTGCT-3'
TNF-α	5'-TCAGTTCATGGCCAGAC-3'	5'-GTTGTCTTTGAGATCCATGCCATT-3'
IL-1β	5'-CCCTGAACTCAACTGTGAAATAGCA-3'	5'-CCCAAGTCAAGGGCTTGAA-3'

2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，各组数据间采用单因素方差分析检验。

3 结果

3.1 UC 大鼠结肠炎症评分

与对照组相比，模型组肠壁与周围组织粘连，肠管增粗，剖开可见溃疡灶，溃疡病变处肠壁增厚，周边黏膜充血水肿，镜下结肠黏膜水肿，黏膜层及浆肌层可见多量淋巴细胞，浆细胞及中性粒细胞浸润，明显的隐窝脓肿，溃疡形成，溃疡表面可见坏死层，肉芽组织形成；TWPT 各剂量组及 AZA 组肠壁与周围组织粘连较轻或无，溃疡少见，隐窝结构基本完整，中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞少量浸润，其中 TWPT 高剂量组、AZA 组肠壁与周围组织少有粘连，肠管未见明显增粗，肠壁轻度增厚，剖开未见明显溃疡，有轻度黏膜充血水肿，镜下黏膜主要表现为中度慢性炎症，部分黏膜及黏膜下层有少量炎性细胞浸润。治疗 14 d 后，与对照组相比，模型组大鼠 DAI、大体形态损伤以及组织学评分明显增加 ( $P < 0.001$ )；与模型组相比，TWPT 高剂量组及 AZA 组结肠炎症评分均有明显降低 ( $P < 0.001$ )；与 AZA 组相比，TWPT 高剂量组结肠炎症

评分无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。远端结肠组织大体图见图 1，病理图见图 2，具体炎症评分见表 3。

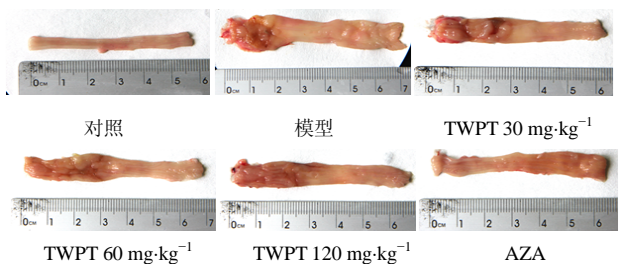


图 1 远端结肠组织大体图

Fig. 1 General pictures of distal colon tissue

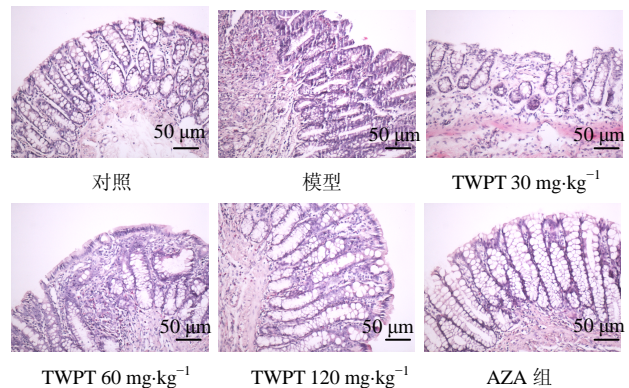


图 2 远端结肠组织病理图

Fig. 2 Pathological pictures of distal colon tissue

表 3 TWPT 对 UC 大鼠结肠炎症评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

Table 3 Influence of TWPT towards inflammatory scores of colon in UC rat ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	DAI 评分	大体形态损伤评分	结肠黏膜组织损伤评分
对照	—	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	—	1.60 ± 0.76 <sup>***</sup>	5.40 ± 2.21 <sup>***</sup>	13.27 ± 3.50 <sup>***</sup>
TWPT	30	1.01 ± 0.39	4.00 ± 2.04	10.00 ± 3.92
	60	1.13 ± 0.30	5.80 ± 2.18	7.82 ± 3.25 <sup>#</sup>
	120	0.87 ± 0.25 <sup>###</sup>	3.93 ± 1.94 <sup>###</sup>	5.45 ± 2.73 <sup>###</sup>
AZA	60	0.70 ± 0.28 <sup>###</sup>	3.64 ± 1.74 <sup>###</sup>	7.00 ± 2.57 <sup>###</sup>

与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$   
<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs model group

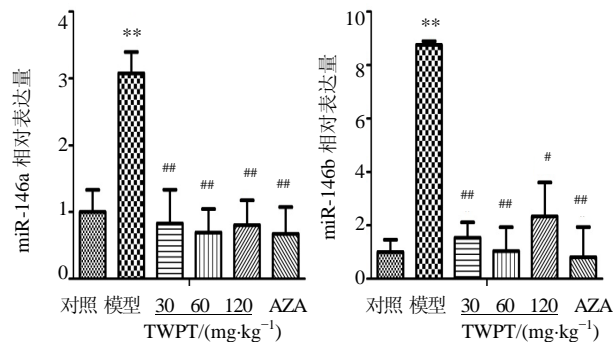


### 3.2 结肠组织 miR-146a 及 miR-146b 表达水平

与对照组相比, 模型组大鼠结肠组织中 miR-146a 和 miR-146b 表达明显增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, TWPT 及 AZA 均可显著抑制 miR-146a、miR-146b 表达 ( $P < 0.05$ 、0.01)。从抑制强度而言, TWPT 中剂量组对 miR-146a、miR-146b 的抑制作用最强, TWPT 高剂量组略弱于 TWPT 中剂量组 ( $P < 0.05$ )。各组结肠组织中 miR-146a 和 miR-146b 的表达情况见图 3。

### 3.3 结肠组织 TLR4/MyD88 依赖信号通路相关分子 mRNA 的表达

对 TLR4/MyD88 依赖信号通路的各节点分子 mRNA 表达水平 (TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) 而言: 与对照组相比, 模型组中这些重要节点分子的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01)。与模型组相比, TWPT 呈剂量依赖性地抑制该信号通路上各节点分子 mRNA 的表达, 其中 TWPT 高剂量组中各节点分子 mRNA 表达水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ 、0.01)。TWPT 高剂量组对 TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B mRNA 表达的抑制作用略强于 AZA 组, 而对该信号通路的末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  mRNA 水平的抑制作用却略逊于 AZA 组, 但上述 2 种差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各组结肠组织中 TLR4/MyD88 依赖



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

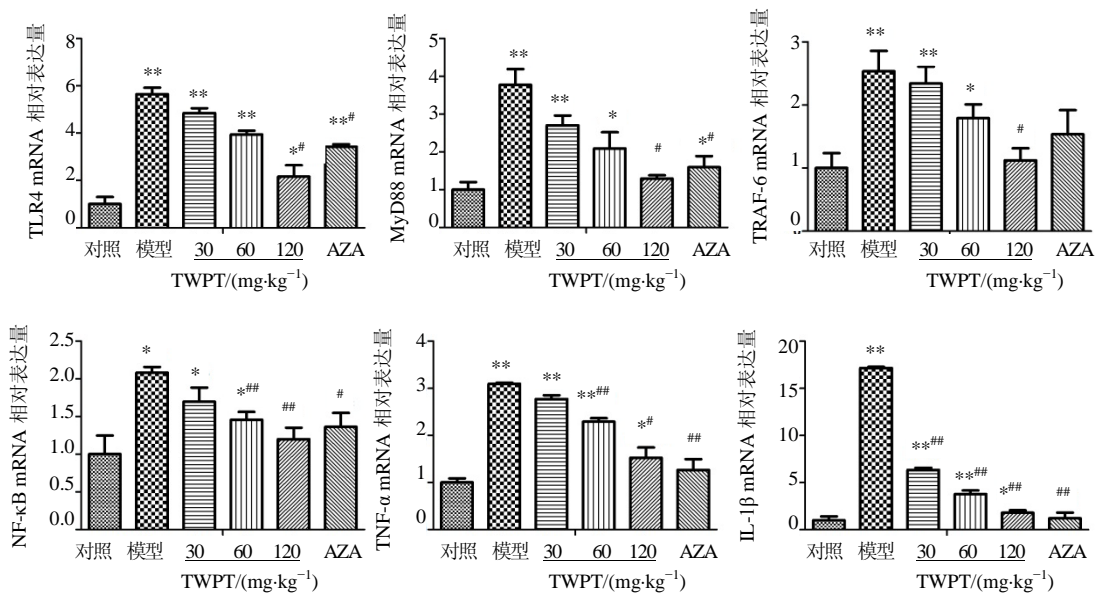
图 3 各组结肠组织中 miR-146a 及 miR-146b 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

Fig. 3 Expression of miR-146a and miR-146b in each colon tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

信号通路相关 mRNA 的表达情况见图 4。

### 3.4 结肠组织 TLR4/MyD88 依赖信号通路相关蛋白的表达

对 TLR4/MyD88 依赖信号通路的各节点分子蛋白表达水平 (TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) 而言: 与对照组相比, 模型组中这些重要节点分子的蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, TWPT 呈剂量依赖性地抑制该信号通路上各节点分子蛋白的表达, 其中 TWPT



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ , 下同  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group, same as below

图 4 各组结肠组织中 TLR4/MyD88 依赖信号通路相关分子 mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

Fig. 4 mRNA expression of related molecule in TLR4/MyD88 dependent signaling pathway in each colon tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

高剂量组中各节点分子蛋白表达水平显著低于模型组 ( $P < 0.01$ )。与 AZA 组比较, TWPT 高剂量组对该信号通路上游因子 (TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B) 蛋白表达的抑制作用略好于 AZA 组, 而对该信号通路的末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  蛋白水平的抑制作用却略逊于 AZA 组, 但上述 2 组差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见图 5 和 6。

#### 4 讨论

TNBS/乙醇 UC 大鼠模型是研究 UC 的极佳模型, 其炎症反应与 TNBS 引起的免疫异常反应密切相关<sup>[11]</sup>。本研究在 TNBS/乙醇灌肠造模后, 观察模型组造模后一般情况, 发现造模 2 d 后模型组大鼠出现精神、饮食、毛发、大便次数及性状的变化, 隐血测试阳性。造模后 DAI 评分浮动于 7~13 分, 较对照组显著升高, 实验结束后解剖大鼠, 观察其结肠组织, 均可见病变部位组织与周围组织粘连,

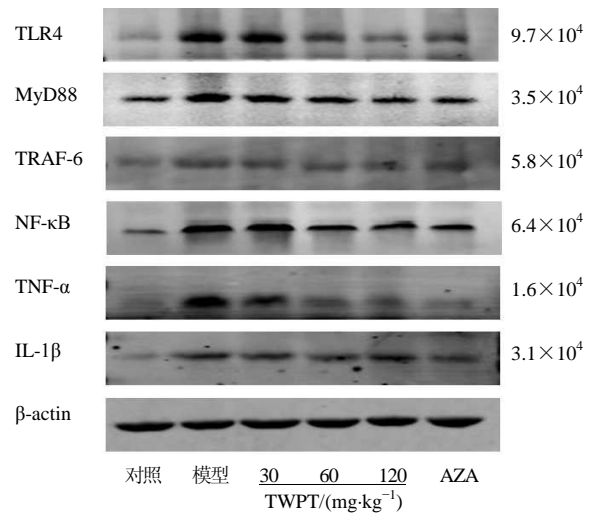


图 5 Western blotting 法检测 TLR4/MyD88 依赖信号通路相关蛋白条带图

Fig. 5 Western blotting analysis of related proteins in TLR4/MyD88 dependent signaling pathway

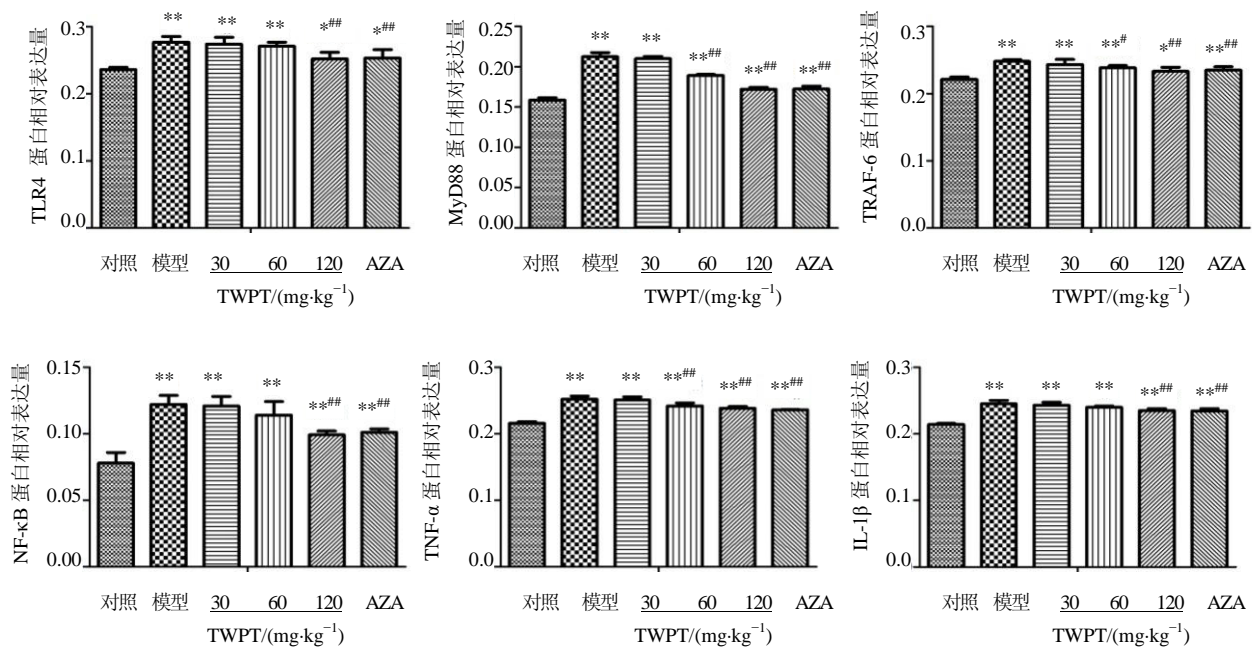


图 6 各组结肠组织中 TLR4/MyD88 依赖信号通路相关蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

Fig. 6 Protein expression of related molecule in TLR4/MyD88 dependent signaling pathway in each colon tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

有较多、较大的溃疡病灶, 周围组织充血水肿, 高倍镜下可见结肠黏膜水肿, 黏膜层及浆肌层可见大量炎症细胞浸润, 溃疡形成, 溃疡表面可见坏死层, 肉芽组织形成, 结肠组织大体形态及镜下组织病理学评分较对照组均有显著升高 ( $P < 0.01$ ), 证实本研究 TNBS/乙醇方法制备大鼠溃疡性结肠炎模型成功。

用 TWPT 进行 3 d 的 ig 治疗后, 可见大鼠精神

状态开始好转, 进食、饮水量及活动量较模型组好转明显, ig 8 d 后, 大便逐渐成形, 偶有稀便, 肛周皮毛稍粘, 但无便血, 体质量有所恢复。实验结束后观察大体形态可见, TWPT 高剂量组大鼠肠道黏膜溃疡、炎症状态较模型组改善明显 ( $P < 0.01$ ); 光镜下可见与模型组相比, TWPT 高剂量组淋巴细胞、中性粒细胞、浆细胞等炎性细胞浸润减少, 偶可见溃疡, 溃疡较浅表 ( $P < 0.01$ ); 与 AZA 组镜下

组织学评分有所降低 ( $P < 0.05$ ), 大体评分略高 ( $P > 0.05$ )。提示 TWPT 对 UC 大鼠临床症状的改善上及黏膜愈合上具有一定作用, 该作用与 AZA 相比相当或强于 AZA。

MicroRNA (miRNA) 是一种由 19~22 个核苷酸组成的非编码微小内源性 RNA, 它可以作用于 3' 非编码区 (3'untranslated region, 3'UTR), 最终通过抑制 mRNA 转录或目标 mRNA 降解的方式, 调控基因表达<sup>[12]</sup>。因 miRNA 绑定方式的多样性, miRNA 在 UC 发病过程中扮演重要角色<sup>[13]</sup>。研究表明 miR-146a、miR-146b 大多作为一种保护因子, 抑制肠道炎症的发生<sup>[14-15]</sup>。而与以往的文献研究不同, 本研究发现: 与对照组相比, TNBS/乙醇 UC 大鼠模型中 miR-146a 和 miR-146b 表达明显增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 药物 TWPT 及 AZA 均可显著抑制 miR-146a 和 miR-146b ( $P < 0.01$ )。从抑制强度而言, TWPT 中剂量组对 miR-146a 和 miR-146b 的抑制作用最强, TWPT 高剂量组略逊于 TWPT 中剂量组 ( $P < 0.05$ )。该现象可能提示, TWPT 对 miR-146a 和 miR-146b 的作用存在一定剂量限制性。

与此同时, 本研究分别从蛋白及 mRNA 水平探讨 TLR4/MyD88 依赖信号通路在炎症发生中的变化, 以及 TWPT 对此的影响。

由于 TLR4 可以识别病原体相关分子模式或损伤相关分子模式, 经过中间接头蛋白的介导激活相关信号激酶, 导致转录因子活化, 从而使炎症效应分子转录表达, 完成天然免疫应答或激活获得性免疫反应和炎症反应。TLR4 信号通路按是否需要接头蛋白 MyD88 介导, 主要分 MyD88 依赖和非依赖的信号通路<sup>[16]</sup>。在 MyD88 依赖的通路中, TLR 通过 MyD88 募集和活化下游白介素-1 受体相关激酶 4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4)、白介素-1 受体相关激酶 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1)、白介素-1 受体相关激酶 2 (interleukin-1 receptor-associated kinase 2, IRAK2) 和 TRAF-6, 进而激活丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、干扰素调节因子 5 (interferon regulatory factor 5, IRF5) 和 NF- $\kappa$ B 通路完成末端炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的转录、释放<sup>[17]</sup>。因此, 本研究将 TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B 作为检测分子, 能反映 TLR4/MyD88 依赖信号通路在炎症发生中的改变, 并通过对末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的检测来阐

述该信号通路对炎症因子的调控作用。

针对 TLR4/MyD88 依赖信号通路的上游分子 (TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B) 而言, Western blotting 及 RT-PCR 结果均显示: 与对照组相比, 该信号通路上游分子无论在 mRNA 水平还是蛋白水平, 模型组表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。提示该疾病模型与 TLR4/MyD88 依赖信号通路的异常表达密切相关。与模型组相比, TWPT 呈剂量依赖性地抑制该信号通路的上游因子, 其中高剂量组与模型组具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。同时, TWPT 对 TLR4、MyD88、TRAF-6、NF- $\kappa$ B 组成的级联反应无论在 mRNA 及蛋白水平, 其抑制趋势均呈现递减现象, 且蛋白水平更典型。与阳性对照 AZA 组比较, 高剂量 TWPT 对该信号通路上游因子的抑制作用略好于 AZA 组, 但无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。提示 TWPT 与 AZA 均能通过抑制 TLR4/MyD88 依赖信号通路来达到抗炎的目的, TWPT 对该信号通路的抑制程度略好于 AZA, 抑制 TLR4/MyD88 依赖信号通路为 TWPT 抗炎的途径之一。

末端炎症因子的 Western blotting 及 RT-PCR 结果均显示: 与对照组相比, 该信号通路末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  无论在 mRNA 水平还是蛋白水平模型组表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, TWPT 呈剂量依赖性地抑制该信号通路的末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$ , 其中高剂量组与模型组具有显著差异 ( $P < 0.01$ )。与阳性对照 AZA 比较, 高剂量 TWPT 对该信号通路末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的抑制作用略逊于 AZA 组, 但无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。提示 TWPT 与 AZA 均对末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  具有抑制作用。与抑制 TLR4/MyD88 依赖信号通路的上游分子作用程度相比, TWPT 对末端炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的抑制作用未显示略好于 AZA 的趋势。这些现象提示, 药物对信号通路调控的复杂性, 这些复杂性可能会影响到药物最终的抗炎结果。

研究结果提示, 中剂量 TWPT 对 miR-146a 和 miR-146b 的抑制作用最强, 高剂量 TWPT 略逊于中剂量, 但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。与 TWPT 抑制 TLR4/MyD88 依赖信号通路及末端炎症因子作用与剂量呈正相关不同, TWPT 对 miR-146a 和 miR-146b 的作用未表现出这种正相关的趋势。既往文献提示 miR-146a 和 miR-146b 的抑制作用也并非局限在 TLR4/MyD88 依赖信号通路上, 它也可通过抑制

SHH 信号发挥抗炎作用<sup>[18]</sup>, 这提示 TWPT 调控 miRNAs 及信号通路作用也应具有复杂性, 有待进一步研究。

综上所述, 本研究显示在 TNBS/乙醇 UC 大鼠模型中, TWPT 能通过抑制 miR-146a 和 miR-146b 的表达, 并能抑制 TLR4/MyD88 依赖信号通路及炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  释放, 对信号通路及炎症因子的作用强度与剂量呈正相关。

#### 参考文献

- [1] Zhu H, Li Y R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence [J]. *Exp Biol Med*, 2012, 237(5): 474-480.
- [2] 丁海荣, 王丙信, 任清华, 等. 复方甘草酸苷联合柳氮磺吡啶治疗溃疡性结肠炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(3): 367-370.
- [3] 刘茉莉, 陈刚, 林琳, 等. 复方肠泰对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎治疗作用的研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(1): 52-56.
- [4] Zhang C, Jiang M, He X J, *et al.* Clinical trials of integrative medicine for rheumatoid arthritis: Issues and recommendations [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(6): 403-407.
- [5] 池婕, 林兵, 刘志宏, 等. 基于最小二乘回归分析法的雷公藤多苷片免疫抑制作用谱效关系研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2755-2758.
- [6] González-Navajas J M, Fine S, Law J, *et al.* TLR4 signaling in effector CD4<sup>+</sup> T cells regulates TCR activation and experimental colitis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(2): 570-581.
- [7] Schulte L N, Westermann A J, Vogel J. Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing [J]. *Nucl Acids Res*, 2013, 41(1): 542-553.
- [8] Fitzpatrick L R, Wang J, Le M. *In vitro* and *in vivo* effects of gliotoxin, a fungal metabolite: Efficacy against dextran sodium sulfate-induced colitis in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2000, 45(12): 2327-2336.
- [9] Wallace J L, Keenan C M, Gale D, *et al.* Exacerbation of experimental colitis by NSAIDs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis [J]. *Gastroenterology*, 1992, 102(1): 18-27.
- [10] Geboes K, Riddell R, Ost A, *et al.* A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2000, 47(3): 404-409.
- [11] Driss V, El Nady M, Delbecke M, *et al.* The schistosome glutathione S-transferase P28GST, a unique helminth protein, prevents intestinal inflammation in experimental colitis through a Th2-type response with mucosal eosinophils [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(2): 322-335.
- [12] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [13] Zwiers A, Kraal L, van de Pouw Kraan T C, *et al.* Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production [J]. *J Immunol*, 2012, 188(4): 1573-1577.
- [14] Baltimore D, Boldin M, Taganov K. Modulation of innate immunity receptors' signaling by microRNAs miR-146a and miR-146b: U. S. Patent 8, 669, 235 [P]. 2014-3-11.
- [15] Schulte L N, Westermann A J, Vogel J. Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing [J]. *Nucl Acids Res*, 2013, 41(1): 542-553.
- [16] Saito K, Katakura K, Suzuki R, *et al.* Modulating Toll-like receptor 4 signaling pathway protects mice from experimental colitis [J]. *Fukushima J Med Sci*, 2013, 59(2): 81-88.
- [17] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650.
- [18] Ghorpade D S, Sinha A Y, Holla S, *et al.* NOD2-nitric oxide-responsive micro RNA-146a activates Sonic hedgehog signaling to orchestrate inflammatory responses in murine model of inflammatory bowel disease [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(46): 33037-33048.