

## 槐絳方调控 NLRP3/Caspase-1 通路抗溃疡性结肠炎损伤的机制研究

夏子健<sup>1</sup>, 李亚桐<sup>1#</sup>, 刘晓露<sup>1</sup>, 梅志刚<sup>2\*</sup>, 赵旭<sup>3</sup>, 方凯歌<sup>3</sup>, 付焯<sup>3\*</sup>

1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

2. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

3. 湖北省襄阳市中医医院, 湖北 襄阳 441000

**摘要:**目的 探讨槐絳方对溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的治疗作用以及对 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) /半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 通路的影响。方法 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组以及槐絳方低、中、高剂量 (0.2、0.4、0.8 g/kg) 组, 对照组给予正常饮用水, 其余各组自由饮用 3% 葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 水溶液诱导 UC 模型, 连续 7 d。造模同时各给药组灌肠不同剂量槐絳方, 对照组和模型组灌肠等体积 0.9% 氯化钠溶液, 每日记录各组小鼠体质量、便血、便形等症状改变, 并进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色评估小鼠结肠黏膜组织病理改变, ELISA 法检测结肠组织中白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平, Western blotting 法检测结肠组织中 NLRP3、Caspase-1、Gasdermin D (GSDMD) 蛋白表达。结果 与模型组比较, 槐絳方明显减缓小鼠体质量下降, 有效减轻小鼠结肠炎症状, 降低炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) 和焦亡相关蛋白 (NLRP3、cleaved Caspase-1、GSDMD-N) 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 对 UC 损伤有较好的改善作用, 且呈剂量相关性。结论 槐絳方具有改善 UC 小鼠炎症状态、恢复结肠形态、抑制细胞焦亡作用, 其作用机制与调控 NLRP3/Caspase-1 通路密切相关。

**关键词:** 槐絳方; 溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 焦亡; NOD 样受体热蛋白结构域 3/半胱氨酸蛋白酶-1

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)23-7221-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.016

## Mechanism of Huai Jiang Fang against ulcerative colitis injury via regulating NLRP3/Caspase-1 pathway

XIA Zi-jian<sup>1</sup>, LI Ya-tong<sup>1</sup>, LIU Xiao-lu<sup>1</sup>, MEI Zhi-gang<sup>2</sup>, ZHAO Xu<sup>3</sup>, FANG Kai-ge<sup>3</sup>, FU Yang<sup>3</sup>

1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Xiangyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangyang 441000, China

**Abstract: Objective** To investigate the therapeutic effect of Huai Jiang Fang (槐絳方, HJF) on ulcerative colitis (UC) and explore its possible mechanism through NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)/Caspase-1 pathway. **Methods** C57BL/6 mice were randomized into control group, model group, low-, medium- and high-dose (0.2, 0.4, 0.8 g/kg) HJF groups. Mice in control group were given pure drinking water, and the rest groups were free to drink 3% dextran sodium sulfate (DSS) aqueous solution for 7 d to induce UC mice model. At the same time, mice in treatment group were pre administered with different doses of HJF, mice in control group and model group were pre administered with same dosage of saline solution. The changes of weight, hematochezia and stool shape were recorded. The pathology changes of colonic mucosa tissue were evaluated using HE staining. ELISA was carried out to detect the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in colon tissue. Western blotting was used to detect the

收稿日期: 2021-06-17

基金项目: 湖北省卫生健康委员会 2019—2020 年度面上项目 (WJ2019M070); 湖北省医学青年拔尖人才项目 (EWT2019-48)

作者简介: 夏子健 (1999—), 男, 在读本科生。E-mail: 2811157267@qq.com

\*通信作者: 梅志刚, 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药药理研究。E-mail: meizhigang@hnu.edu.cn

付焯, 女, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事中医药抗炎抗癌转化研究。E-mail: fuyangtcm@aliyun.com

#共同第一作者: 李亚桐 (1999—), 女, 在读本科生。E-mail: 1433763106@qq.com

protein expressions of NLRP3, Caspase-1 and Gasdermin D (GSDMD) in colon tissue. **Results** Compared with control group, HJF significantly slow down the weight loss of mice, effectively alleviate colonic inflammatory symptoms. Inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) levels and proteins associated with pyroptosis (NLRP3, cleaved caspase-1 and GSDMD-N) expressions in colon tissue were reduced by HJF ( $P < 0.05, 0.01$ ), which exhibited a beneficial therapeutic effect on UC with a dose-dependent manner. **Conclusion** HJF could improve the inflammatory state, restore colon morphology and inhibit cell pyroptosis in UC mice, and the possible mechanism may be closely related to the regulation of NLRP3/Caspase-1 pathway.

**Key words:** Huai Jiang Fang; ulcerative colitis; dextran sodium sulfate; pyroptosis; NLRP3/Caspase-1

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以腹泻、脓血便、腹痛、发热和体质量减轻等为主要临床症状的慢性非特异性肠道炎症性疾病<sup>[1]</sup>。病变主要位于结肠的黏膜层, 以大肠黏膜和黏膜下层连续性、弥漫性炎症改变为特点。目前该病病因及发病机制尚不明确, 涉及遗传、环境、心理、感染、肠道微生态失调等<sup>[2]</sup>。近年来随着人们生活、饮食、工作习惯的改变, UC 在我国的发病率明显增加, 目前规范化治疗药物如柳氮磺吡啶、美沙拉嗪等可有效缓解 UC 的发作, 但存在服药周期长、不良反应多、易复发等问题。

中医药在缓解 UC 患者症状、降低复发率和提高患者生活质量方面展现出独特优势<sup>[3]</sup>。槐絳方是湖北省襄阳市中医医院肿瘤科自制方剂, 由黑絳丹与槐花炭组成。黑絳丹源于刘禹锡“鸡子乱发膏”, 由血余炭和鸡子黄 2 味中药组方而成, 故又名血余蛋黄油, 对于治疗慢性溃疡和多种炎症均有显著效果<sup>[4]</sup>。经过多年临床试验结果表明, 槐絳方可以显著改善急性放射性肠炎患者腹泻、腹痛、里急后重、黏液血便等主症, 对于口干、食欲减退等伴随症状有较好疗效<sup>[5]</sup>。为进一步阐明其作用机制, 更好推广槐絳方的临床应用, 本研究以葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的急性 UC 为模型, 用槐絳方保留灌肠进行治疗, 基于 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) /半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 通路探讨其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

槐絳方由湖北省襄阳市中医医院制剂科提供, 由血余炭、槐花炭、蛋黄油组成 (血余炭与槐花炭比例为 2:3), 经三峡大学医学院药学系何毓敏博士鉴定, 经高效液相色谱法测定其中芦丁、槲皮素质量分数分别不少于 3% 和 0.5%。

DSS (相对分子质量 36 000~50 000, 批号 160110) 购自美国 MP Biomedicals 公司; 4% 多聚甲

醛 (批号 G1101) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) ELISA 试剂盒 (批号 abs520001)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒 (批号 abs520010) 购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司; Caspase-1 抗体 (批号 Ab179515) 购自英国 Abcam 公司; NLRP3 抗体 (批号 A5652)、Gasdermin D (GSDMD) 抗体 (批号 A18281) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;  $\beta$ -actin 抗体 (批号 BM0627)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 BA1054) 购自武汉博士德生物工程有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 P0010) 购自碧云天生物技术研究所; 粪便潜血检测试剂盒 (批号 C027-1-1) 购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 仪器

AL204 型电子分析天平、LP115 型 pH 计 (德国 Metter-Toledo 公司); SYRO-100L 型超纯水机 (四川纯洁科技有限公司); LD25-2 型低速离心机 (北京京立离心机有限公司); CT15RT 型台式高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备工程有限公司); HM 340 E 型石蜡切片机 (德国 Microm 公司); YD-A、B 型生物组织摊片烤片机 (金华市益迪医疗设备有限公司); DYY-8C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); ITS-1 型水平摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); NFINITE 200 PRO 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)。

### 1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 购自三峡大学实验动物中心, 动物许可证号 SCXK (鄂) 2017-0012。小鼠饲养于三峡大学实验动物中心 SPF 级动物实验室, 温度 18~22  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 55%~65%, 12 h 明暗循环, 食用饲料和饮用水消毒后由动物自由摄取。饲养过程严格按照三峡大学 SPF 级实验动物中心操作规程进行。动物实验通过三峡大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 201909041)。

## 2 方法

### 2.1 实验药物的制备

**2.1.1 DSS 的制备** 用电子天平称取 DSS 3 g, 溶解于 100 mL 超纯水中, 配成 3% DSS 溶液。

**2.1.2 槐绛方的制备** 取鸡蛋 10 枚, 煮熟后剥离蛋白, 剩余蛋黄用铁锅大火熬制成蛋黄油备用。分别称取 0.2、0.4、0.8 g 槐绛方复方颗粒, 用事先备好的温水进行溶解, 待颗粒全部溶解后向槐绛方各剂量组中分别加入 1、2、4 滴蛋黄油, 并充分混匀, 最后加热煎煮定容至 10 mL 溶液, 配成低、中、高质量浓度的槐绛方。实验用药浓度的确定是根据临床上患者的用药剂量, 按照体表面积进行小鼠等量剂量换算作为中剂量组的治疗剂量, 即 0.4 g/kg, 参考本课题组预实验结果, 最终确定低、高剂量组剂量分别为 0.2、0.8 g/kg。

### 2.2 造模、分组与给药

小鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为 5 组, 用苦味酸对每只小鼠进行标记, 分别为对照组、模型组以及槐绛方低、中、高剂量 (0.2、0.4、0.8 g/kg) 组, 每组 8 只。除对照组每天给予正常饮用水外, 其余各组小鼠给予等体积含 3% DSS 的饮用水, 每隔 1 d 更换 1 次新鲜的 DSS 溶液, 自由饮用 7 d, 诱导 UC 模型; 造模同时, 各给药组灌肠相应药物, 模型组和对照组灌肠等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 7 d<sup>[6]</sup>。

### 2.3 样本采集与处理

给药结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 于第 8 天颈椎脱臼法处死, 采用十字法剖开腹腔, 剥离结肠 (小肠末端至直肠末端), 操作迅速, 取结肠肠段样本, 用标尺测量各组小鼠结肠长度并进行统计学分析。用预冷的 0.9% 氯化钠溶液清除肠内粪便, 取近肛门端 2 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, 用于苏木素-伊红 (HE) 染色; 剩余结肠组织用 0.9% 氯化钠溶液清洗干净后置于冻存管中, 于 -80 °C 保存备用。

### 2.4 一般情况评价与疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分

给药后, 每天在同一时间观察并记录各组小鼠的毛发光泽、精神活动、体质量变化、摄食量及饮水量、大便性状、有无便血及便血程度 (若无肉眼可见血便则用粪便隐血检测试剂盒来判断大便有无隐血情况)。每天定时称定小鼠体质量后计算其体质量变化率, 综合肉眼观察小鼠粪便性状改变情况、隐血以及便血情况, 按照表 1 标准进行 DAI 评分<sup>[7]</sup>, 以评价小鼠炎症活动变化。

### 2.5 结肠组织 HE 染色病理形态学分析

取经过 4% 多聚甲醛溶液固定的结肠组织, 经过常规脱水、透明化、石蜡包埋、切片、烤片、脱蜡、HE 染色处理后封片, 于光学显微镜下采用盲法读片观察各组小鼠结肠的形态学变化。

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

评分	体质量下降率/%	粪便状况	便血情况
0	0	正常 (成形大便)	阴性
1	0~5	介于两者之间	介于两者之间
2	5~10	松散 (糊状, 半成形大便)	隐血
3	10~20	介于两者之间	介于两者之间
4	>20	腹泻 (伴脓血便, 黏于肛门的稀便或血便)	血便

### 2.6 ELISA 法检测结肠组织中炎症因子水平

取保存于 -80 °C 的小鼠结肠组织, 称定 40~60 mg, 加入 9 倍量 PBS 溶液混合, 用剪刀剪碎组织并充分匀浆, 4 °C、3000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平。

### 2.7 Western blotting 法检测结肠 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达

取结肠组织, 加入裂解液匀浆提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 蛋白

样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 室温封闭 2 h 后分别加入 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 和  $\beta$ -actin 抗体 (1:1000), 4 °C 孵育过夜; TBST 充分洗去多余一抗, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:50 000), 室温孵育 2 h; TBST 充分洗去多余二抗, 将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1:1 混匀, 滴加工作液于 PVDF 膜上反应, 待荧光带明显后, 用滤纸吸去多余的底物液, 覆上保鲜膜, X 光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影, 冲洗胶片后晾干胶片

并进行扫描,用IPP分析胶片灰度值。

### 2.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件和GraphPad Prism 8作图软件进行数据分析及处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均值间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。

## 3 结果

### 3.1 槐絳方对UC小鼠一般情况与DAI评分的影响

对照组小鼠毛发光滑、黑亮有光泽,体质量呈上升趋势,活动与精神状态良好,进食饮水均正常,粪便呈棕黑色麦粒状,未出现腹泻、血便、黏液便等。模型组小鼠在造模期间,进食与饮水量呈每日逐渐减少趋势,行动迟缓、精神萎靡不振、毛发光泽日渐黯淡无光、体质量明显下降;造模第2天开始出现软便、水样便等情况,于第3~4天模型组所有小鼠均出现大便隐血或血便。各给药组小鼠造模期间毛发光泽、活动与精神状态、进食及饮水量均发生改变,出现腹泻、便血等症状,给予槐絳方治疗后,各组小鼠症状均轻于模型组。如图1所示,与对照组相比,模型组小鼠DAI评分显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠DAI评分显著降低( $P < 0.01$ ),表明槐絳方对UC小鼠具有较好的改善作用,且呈较为明显的剂量相关性。

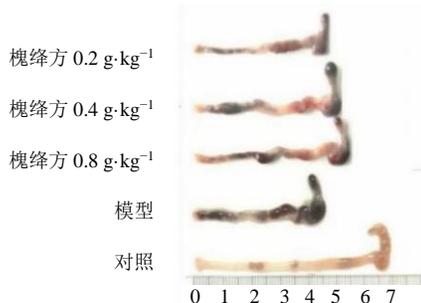


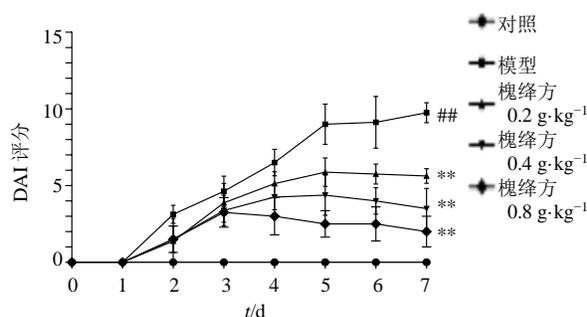
图2 槐絳方对UC小鼠结肠长度的影响

Fig. 2 Effect of Huai Jiang Fang on colon length of UC mice

不同程度的改善,槐絳方低、中剂量组结肠表面表现为欠光滑状态,槐絳方高剂量组表面较光滑。

### 3.3 槐絳方对UC小鼠结肠组织病理变化的影响

如图3所示,对照组小鼠结肠黏膜上皮完整、隐窝结构正常、腺体呈整齐排列且结构完整,未见炎性细胞浸润、充血、水肿及溃疡形成,为正常结肠黏膜。模型组小鼠黏膜上皮脱落不完整、隐窝破坏明显、腺体大部分消失且排列紊乱,有大量炎性细胞浸润,部分细胞大小不等、核大深染,且有大量溃疡分布。各给药组结肠组织病理症状较模型组



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 belows

图1 槐絳方对UC小鼠DAI评分的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effect of Huai Jiang Fang on DAI score of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 3.2 槐絳方对UC小鼠结肠长度的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠长度显著缩短( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠结肠长度显著增加( $P < 0.05, 0.01$ ),呈剂量相关性。对照组结肠黏膜光滑,未有充血、水肿、溃疡等变化;模型组小鼠结肠组织肠壁增厚,周围出现粘连,且肉眼可见黏膜有充血、溃疡改变、出血等表现,肠壁水肿较明显;各给药组小鼠肠组织黏膜充血、溃疡改变、出血等症状与模型组相比有

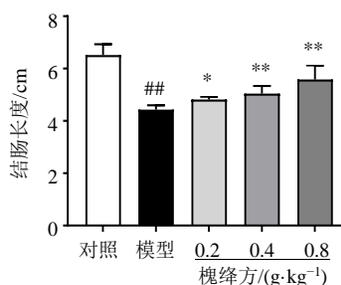


图2 槐絳方对UC小鼠结肠长度的影响

Fig. 2 Effect of Huai Jiang Fang on colon length of UC mice

明显改善,隐窝破坏减轻、炎性细胞浸润数目减少、腺体存在且排列较整齐,整体上损伤减轻;其中槐絳方低剂量组腺体部分破坏消失、黏膜损伤较模型组减轻、溃疡面积明显变小,表现为仅有少量溃疡;槐絳方中、高剂量组症状改善明显,黏膜均较连续完整、腺体排列整齐、无明显溃疡形成,以槐絳方高剂量组疗效最佳,炎症细胞浸润明显减轻。

### 3.4 槐絳方对UC小鼠结肠组织IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠

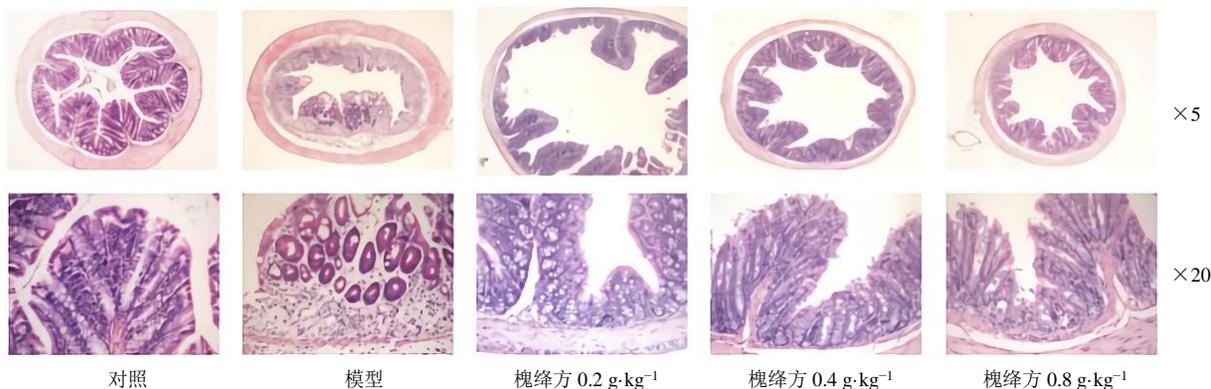


图3 槐绛方对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响

Fig. 3 Effect of Huai Jiang Fang on pathological changes of colon tissue of UC mice

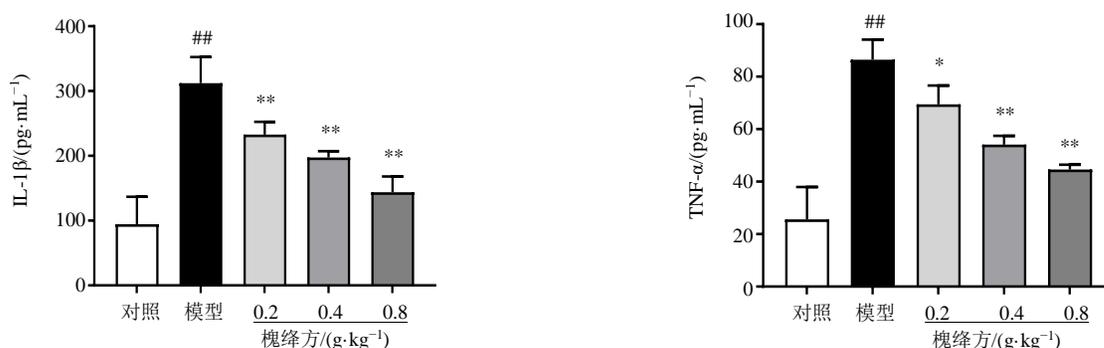


图4 槐绛方对 UC 小鼠结肠组织 IL-1β 和 TNF-α 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Effect of Huai Jiang Fang on IL-1β and TNF-α levels in colon tissue of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组织 IL-1β、TNF-α 水平明显升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，各给药组小鼠结肠组织 IL-1β、TNF-α 水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )，呈剂量相关性。

### 3.5 槐绛方对 UC 小鼠结肠组织 NLRP3、GSDMD-N 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组结肠组织 NLRP3、cleaved Caspase-1 以及 GSDMD 裂解后产生的 GSDMD-N 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )；与模型组比较，各给药组结肠组织 NLRP3 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )，槐绛方中、高剂量组结肠组织 GSDMD-N 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )，呈剂量相关性。

## 4 讨论

槐绛方由槐花炭、血余炭和蛋黄油组成。槐花炭由槐花炒制而成，槐花具有凉血止血、清肝泻火的作用，为中医常用的止血药；炒炭作为中药常用的炮制方法之一，已有近千年的使用历史，有研究证实槐花炒炭后止血作用更明显<sup>[8]</sup>。蛋黄油为雉科

动物家鸡鲜卵的卵黄提取物，其相关药理作用研究较少，历代中药古籍将其作用归于“消肿解毒，敛疮生肌”，近年来研究发现蛋黄油有促进创面愈合、抗氧化、抗衰老、镇痛、提高记忆力、调血脂等作用，临床用于治疗消化道疾病、疮痍肿毒及溃疡、烧烫伤及外伤、高脂血症、冻伤、皲裂等<sup>[9]</sup>。血余炭是用人发经煅制而成的炭化物，为临床较常用中药，具有止血、化瘀、生肌、利尿之功效，现代药理学研究证实了其凝血止血、抗菌消炎、促进创面愈合等药理作用<sup>[10]</sup>。本课题组前期临床观察发现，槐绛方灌肠治疗对 UC 具有较好的临床疗效。

UC 属于炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)，是一组病因不明、频繁复发的慢性炎症性自身免疫性疾病。目前临床常用的化学药物包括水杨酸类、类固醇激素、免疫抑制剂、生物制剂等，虽然在一定程度上缓解了里急后重、腹泻、腹痛、黏液脓血便等主要临床症状，但是随着此类药物使用周期的延长，药物的不良反应显著<sup>[11]</sup>。因此，诱导缓解、维持缓解和预防并发症为目前治疗

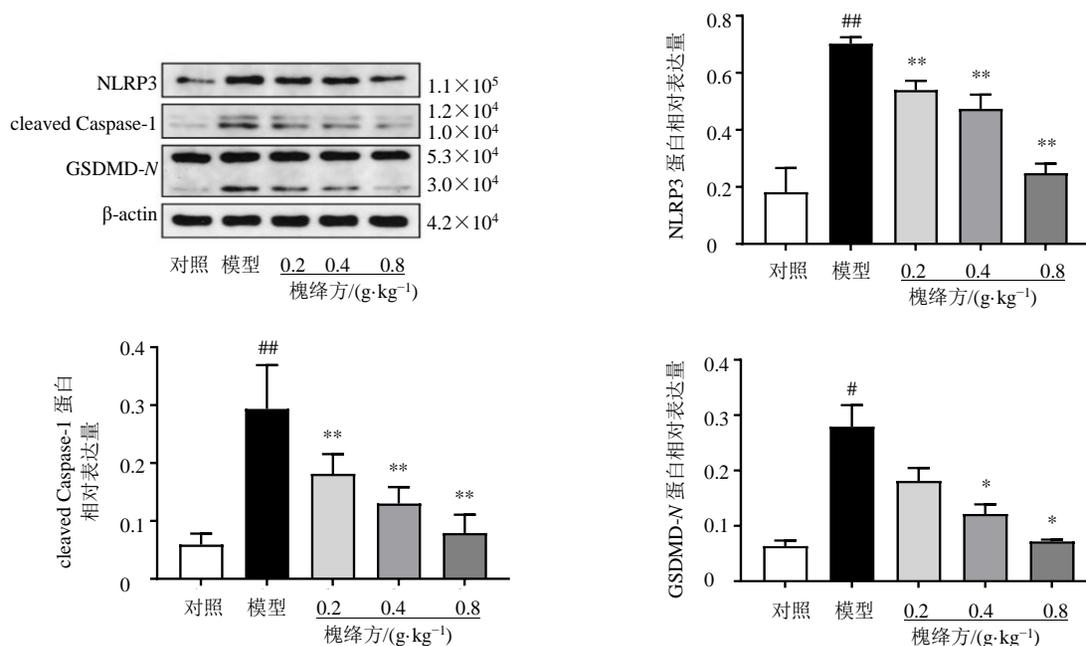


图5 槐絳方对 UC 小鼠结肠组织 NLRP3、GSDMD-N 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 5 Effect of Huai Jiang Fang on NLRP3, cleaved Caspase-1 and GSDMD-N protein expressions in colon tissue of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

UC 的 3 大主要临床目标<sup>[12]</sup>。中医药具有急则治其标，缓则致其本的临床优势，较好地契合了 UC 临床治疗上述 3 大目标，备受医患青睐。本课题组以往研究发现，槐絳方保留灌肠可以通过抑制炎症因子的产生，降低肠黏膜的炎症反应，来减轻肠黏膜损伤，修复溃疡面，进而改善急性放射性肠炎患者的临床症状，且具有治愈率高、安全性高、并发症少等优点<sup>[13]</sup>。然而，槐絳方是否对炎症引起的肠黏膜细胞程序性死亡如细胞焦亡具有改善作用，此前尚未探索，故本研究拟从细胞焦亡的视角，进一步剖析槐絳方的潜在作用机制。

细胞焦亡是一种新的程序性炎症死亡，其信号通路分为 Caspase-1 依赖性的经典途径和依赖 Caspase-4、Caspase-5、Caspase-11 的非经典途径。经典途径中，Caspase-1 在整个过程中起重要作用，以无活性的酶原形式 (pro-Caspase-1) 存在于细胞质中，其激活依赖于经典型炎性小体发挥作用，而 NLRP3 炎性小体是被研究最多也是最重要的一个。NLRP3 炎性小体由 NLRP3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 蛋白及 pro-Caspase-1 蛋白 3 部分组成。当宿主受到外源性或内源性损伤时，NLRP3 激活，ASC 和 Caspase-1 被募集。激活的 NLRP3 与 ASC 相互作用，

pro-Caspase-1 通过 CARD 与 ASC 结合组装成 1 个大的胞质复合体，继而二聚体化，在此过程中形成发挥其活性作用的 cleaved Caspase-1 片段，即大亚基片段 p20 和小亚基片段 p10，最终形成具有活性的 Caspase-1，不仅可将无活性的 IL-1 $\beta$  前体及 IL-18 前体通过剪切转变成成熟的 IL-1 $\beta$  和 IL-18<sup>[14]</sup>，还可对 GSDMD 蛋白进行切割，活化裂解产生 GSDMD-N 末端片段结合于细胞膜上<sup>[15]</sup>，继而引发细胞焦亡。本研究以 UC 小鼠为研究对象，研究 UC 小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平以及 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达情况，并比较相互间的差异，拟从 NLRP3/Caspase-1 信号通路切入，从细胞焦亡角度为 UC 的临床治疗提供新靶点。

本研究采用经典的 UC 造模方法，即 DSS 化学诱导法来建立 C57BL/6 小鼠急性 UC 模型<sup>[16]</sup>。根据造模后小鼠排便便血、饮食饮水量变化、体质量变化、DAI 评分以及结肠组织学等方面改变，来判断造模是否成功。结果显示，模型组小鼠饮食饮水量明显下降、体质量明显减轻、排便便血、DAI 评分等均呈明显的上升趋势，且小鼠表现为毛色光泽变差、活动性差、反应迟缓等状态；经解剖发现，模型组小鼠结肠明显缩短，且有大量溃疡分布，符合 UC 的形态学改变；HE 染色显示，模型组小鼠结肠

黏膜上皮脱落不完整、隐窝破坏明显、腺体大部分消失且排列紊乱，杯状细胞明显减少，有大量中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润于黏膜层和黏膜下层，部分细胞大小不等、核大深染，均符合 UC 的组织学改变。以上结果表明，本研究成功建立了小鼠 UC 模型。此外，模型组结肠组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平以及 NLRP3、cleaved Caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白表达水平均升高，各给药组上述指标均不同程度地降低，且槐绛方中、高剂量组效果更为显著，表明槐绛方可能通过调控 NLRP3/Caspase-1 通路抑制 UC 小鼠结肠组织的细胞焦亡来改善 UC 症状。

UC 患者血清中 IL-1 $\beta$  水平明显高于正常对照组，而重度病情患者血清中 IL-1 $\beta$  水平明显高于轻、中度患者<sup>[17]</sup>。结肠组织中的 IL-1 $\beta$  可诱导中性粒细胞产生大量炎性物质，引起炎症反应，导致结肠黏膜充血、水肿、坏死，产生溃疡，与本研究结果相符合，UC 小鼠结肠组织 IL-1 $\beta$  水平显著升高，而各给药组结肠组织 IL-1 $\beta$  水平显著降低。TNF- $\alpha$  是一种促炎免疫细胞因子，被临床公认为是参与介导肠道黏膜损伤的关键，可灵敏反映 UC 的炎症损伤程度。本研究结果显示，给予槐绛方后，结肠组织 TNF- $\alpha$  水平也显著降低，表明槐绛方具有一定的抗炎作用。IL-1 $\beta$  的激活、成熟与 NLRP3 炎症小体密不可分<sup>[18]</sup>，在 NLRP3 炎症小体活化后可激活 Caspase-1 的活化，而活化的 Caspase-1 又可以切割 pro-IL-1 $\beta$ ，产生成熟的 IL-1 $\beta$ <sup>[19]</sup>。Bauer 等<sup>[20-21]</sup>研究发现，DSS 可通过 NLRP3 炎症小体的装配，激活 Caspase-1 从而诱导结肠炎症损伤，敲除 NLRP3 基因或抑制 Caspase-1 可有效减轻 DSS 诱导的小鼠结肠病理症状。由此可见，NLRP3/Caspase-1 通路的激活与 UC 的病理发展过程关系密切，故该通路可能为探寻中医药防治 UC 提供新的靶标。

综上所述，本研究在前期临床观察结果基础上，基于 NLRP3/Caspase-1 信号通路，从细胞焦亡角度进一步探究了槐绛方治疗 UC 的作用机制，为临床推广应用槐绛方治疗 UC 提供了重要的理论依据，为深入研发槐绛方提供实验佐证。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 张露, 沈洪, 叶柏, 等. 525 例溃疡性结肠炎患者临床特征分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(4): 574-578.

[2] Kaistha A, Levine J. Inflammatory bowel disease: The classic gastrointestinal autoimmune disease [J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2014, 44(11): 328-334.

[3] 韦日娜, 孙平良, 耿曙光, 等. 中药灌肠治疗溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(2): 149-151.

[4] 于明薇, 杨霖, 罗晓琴, 等. 黑绛丹对大鼠放射性皮炎创面细胞凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2017, 58(13): 1145-1149.

[5] 付焯, 田桢, 乔占兵. 槐绛方灌肠治疗急性放射性结肠炎的临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10): 3778-3780.

[6] Chu C C, Hou Y C, Pai M H, et al. Pretreatment with alanyl-glutamine suppresses T-helper-cell-associated cytokine expression and reduces inflammatory responses in mice with acute DSS-induced colitis [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(9): 1092-1099.

[7] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51-58.

[8] 赵雍, 郭静, 刘婷, 等. 槐花制炭后新止血成分的药理研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2346-2349.

[9] 张由芹, 王颖, 武京君. 蛋黄油的炮制方法、药理作用及临床应用的研究 [J]. 山东化工, 2017, 46(14): 97-98.

[10] 刘帅, 李沙沙, 张登禄. 血余炭药理作用及作用机制的研究进展 [J]. 中国药事, 2020, 34(5): 585-588.

[11] Löwenberg M, D'Haens G. Novel targets for inflammatory bowel disease therapeutics [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2013, 15(2): 311.

[12] Blonski W, Buchner A M, Lichtenstein G R. Treatment of ulcerative colitis [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2014, 30(1): 84-96.

[13] 付焯, 王蕾. 槐绛方灌肠治疗放射性结肠炎疗效观察 [J]. 陕西中医, 2014, 35(11): 1503-1504.

[14] 陶慧慧, 陶欣荣. 细胞焦亡: 一种新的细胞程序性坏死 [J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(12): 1219-1221.

[15] Aglietti R A, Estevez A, Gupta A, et al. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes [J]. *PNAS*, 2016, 113(28): 7858-7863.

[16] Kolios G. Animal models of inflammatory bowel disease: How useful are they really? [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2016, 32(4): 251-257.

[17] 王冕柱, 郭彩虹, 陈吉. 溃疡性结肠炎患者血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-10 的表达及其意义 [J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(5): 362-364.

- [18] Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 229-265.
- [19] Mariathasan S, Monack D M. Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(1): 31-40.
- [20] Bauer C, Duewell P, Lehr H A, *et al.* Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: Influence of genetic and environmental factors [J]. *Dig Dis*, 2012, 30(S1): 82-90.
- [21] Bauer C, Duewell P, Mayer C, *et al.* Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome [J]. *Gut*, 2010, 59(9): 1192-1199.

[责任编辑 李亚楠]