

五味子甲素对溃疡性结肠炎大鼠的保护作用

刘永生， 王金菊*
(河南省中医院, 河南 郑州 450002)

摘要：目的 研究五味子甲素对溃疡性结肠炎大鼠的保护作用。**方法** SD 大鼠灌肠三硝基苯磺酸/乙醇制造溃疡性结肠炎模型，确认造模成功后分为模型对照组、美沙拉嗪组及五味子甲素低剂量组、中剂量组、高剂量组。各组大鼠每天进行 1 次灌胃给药，共 2 周。每周测定各组大鼠体质量变化、大便性状及隐血情况，进行大鼠疾病活动指数 DAI 评分，并测定血清转化生长因子（TGF）-β1、白细胞介素（IL）-6、IL-10、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）水平，以及尿液中乳果糖和甘露醇水平，进行组织切片的病理学组织评分。测定结肠组织 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκB-α 和 p-IκB-α 蛋白表达。**结果** 给药 1、2 周时五味子甲素中、高剂量可剂量依赖性降低溃疡性结肠炎大鼠 DAI 评分以及大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平，升高 TGF-β1、IL-10 水平（ $P<0.05$ ）；给药 2 周时五味子甲素中、高剂量可剂量依赖性降低溃疡性结肠炎大鼠尿液中乳果糖、L/M 比值，升高尿液中甘露醇水平、大鼠结肠组织病理学评分及 TLR4、IκBα、p-IκBα、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达（ $P<0.05$ ）。**结论** 五味子甲素对溃疡性结肠炎大鼠具有保护作用，可能与调控血清促炎和抑炎因子水平，降低肠道黏膜通透性及抑制结肠组织中 TLR4/NF-κB 信号通路有关。

关键词：五味子甲素；溃疡性结肠炎；炎性细胞因子；肠道黏膜通透性；TLRs/NF-κB 通路

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2021)03-0774-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.041

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis, UC）是一种常见的慢性肠道非特异性炎症，好发于左半结肠及直肠，可累及整个结肠，病变主要局限在黏膜和黏膜下层^[1]，以腹泻、腹痛、黏液脓血便为主要临床症状。该病给药难度大、可反复发作，病程可多达几十年甚至伴随终生，是世界卫生组织公认的难治性疾病^[2]。此外，研究表明，该病可增加结肠癌的发病风险，降低了患者的生活质量^[3-4]。由于该病的发病机制尚未完全明确，目前普遍认为炎症因子过度表达与免疫功能低下可能是其发病的主要原因，并与遗传、环境和微生物感染等其他因素共同作用有关，临床给药仍以水杨酸类、糖皮质激素、免疫抑制剂等化学药为主，但化学药长期使用的毒副作用较大，且患者的病情迁延不愈，导致出现较多停药现象。五味子甲素是从五味子果实中分离出来的具有生物活性的木脂素，研究表明五味子甲素具有抗炎、抗自由基^[5]、保肝及抑制胃肠平滑肌痉挛^[6]等作用。本研究探讨五味子甲素对大鼠溃疡性结肠炎的保护作用，并且进一步探讨其作用机制，以期为进一步临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 50 只 SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，体质量（200±20）g，由河南省实验动物中心提供，使用许可证号

SYXK（豫）2018-0014。大鼠给予标准颗粒饲料，自由饮用纯净水。恒温动物室的温度为（25±2）℃，相对湿度为（50±10）%，每小时通风换气 8 次，光照随昼夜浮动。实验开始前所有大鼠均适应性饲养 1 周。

1.2 药物与试剂 五味子甲素，批号 61281-38-7，纯度为 98.8%，购自南京道斯夫生物科技有限公司；美沙拉嗪（批号 201803），购自牡丹江恒远药业股份有限公司，国药准字 H20066027，纯度为 99.3%；三硝基苯磺酸，购自美国 Sigma 公司；无水乙醇，购自上海凌峰化学试剂有限公司；干扰素-6（interleukin-6, IL-6）和干扰素-10（interleukin-10, IL-10）试剂盒，购自福州迈新生物技术开发有限公司；转化生长因子 β1（transforming growth factor-β1, TGF-β1），购自北京百诺威生物科技有限公司；肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）-α 试剂盒，购自北京欣博盛生物科技有限公司；Toll 样受体 4（toll like receptor 4, TLR4）、核转录因子（nuclear factor, NF）-κB p65、p-NF-κB p65、NF-κB 抑制蛋白-α（inhibitor of NF-κB-α, IκB-α）、p-IκB-α 抗体，购自美国 Cell Signaling Technology 公司；RIPA 裂解液、β-肌动蛋白（β-actin）抗体、HRP-羊抗大鼠 IgG 二抗和 ECL Prime 蛋白印迹试剂，购自上海碧云天生物技术有限公司。

收稿日期：2020-05-01
基金项目：河南省医学普及规划项目 2017（46 号-0890）
作者简介：刘永生（1973—），男，硕士，副主任药师，从事中药活性成分及药理作用研究。Tel: 13526563699, E-mail: mei_li76@126.com
*通信作者：王金菊（1971—），女，硕士，副主任药师，从事中药活性成分及药理作用研究。Tel: 13526561968

1.3 仪器 T323S 型电子天平, 购自德国 Sartorius 公司; EXL808 全自动酶标仪, 购自美国 Bio-Tek 公司; MSD97K49 型微量离心机, 购自美国 Beckman 公司; DNM-9602G 自动酶标仪, 购自美国 Bio-Tek 公司; 蛋白电泳仪、蛋白转膜仪、化学发光扫描仪, 均购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 造模、分组和给药 随机选取 8 只 SD 大鼠作为正常对照组, 自由饮用纯净水; 其余 42 只 SD 大鼠采用三硝基苯磺酸/乙醇法造模。所有大鼠禁食不禁水 24 h, 采用 10% 水合氯醛 (0.25 mL/100 g) 进行腹腔麻醉, 将 5% 三硝基苯磺酸+50% 乙醇吸入注射器后连接一次性静脉输液针 (2 mm) 并剪去针头, 插入肛门上段约 8 cm, 以 0.02 mL/kg 的剂量缓慢注入 5% 三硝基苯磺酸+50% 乙醇, 轻揉大鼠腹部 1 min。正常对照组大鼠除了用生理盐水替代 5% 三硝基苯磺酸+50% 乙醇溶液进行灌肠外, 其他操作同造模大鼠。

造模后除正常对照组外, 其他大鼠均出现腹泻、黏液脓血便、进食减少等现象, 造模后第 4 天随机选择 2 只大鼠脱臼处死, 尸检显示结肠膜出现充血、水肿并伴有溃疡形成, 则提示建模成功。

将造模大鼠随机分为模型对照组、美沙拉嗪组及五味子甲素高剂量组、中剂量和低剂量组, 每组均为 8 只。造模后第 5 天各组开始给药, 五味子甲素高剂量组、中剂量组和低剂量组大鼠分别灌胃给予五味子甲素 80、40、20 mg/kg, 美沙拉嗪组大鼠灌胃给予美沙拉嗪 0.4 g/kg, 模型对照组和正常对照组大鼠分别灌胃给予同体积的生理盐水。各组给药时间均为 2 周。

2.2 疾病活动指数的测定 实验开始时每天观察动物的体质量、腹泻和大便性状等。按照 Cooper 等^[7] 评分标准评估各组在给药前、给药 1 周和给药 2 周时大鼠疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 的变化, $DAI = (\text{体质量降低评分} + \text{大便形状评分} + \text{血便评分}) / 3$ 。具体评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准			
体质量降低/%	大便性状	血便	评分/分
0	正常	阴性	0
1~5	松软	隐血 (+)	1
6~10	松软	隐血 (++)	2
11~15	腹泻	隐血 (+++)	3
>15	腹泻	肉眼血便	4

2.3 血清促炎和抑炎因子水平的测定 各组大鼠于给药前、给药 1 周和 2 周时尾静脉取血各约 0.5 mL, 室温下静置 30 min, 待血液完全凝固后低温离心后分离得血清, 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定血清 IL-6、IL-10、TGF- β 1 和 TNF- α 水平, 操作时严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.4 肠道黏膜通透性实验 各组大鼠给药 2 周末给药后禁食不禁水 24 h, 分别灌胃给予 2 mL 乳果糖 (lactose, L) 和甘露醇 (mannitol, M) 混合液 (其中含 5% 乳果糖和 2% 甘露醇), 将各组大鼠置于代谢笼, 收集 24 h 内尿液, 离

心, 取 10 mL 尿液加 2 mL 硫柳汞防腐, 于 -70 ℃ 贮存待测。采用高压液相色谱分析法测定乳果糖和甘露醇水平, 计算 L/M 以评估各组大鼠肠道黏膜通透性。

2.5 结肠组织病理学评分 肠道黏膜通透性实验结束后各组大鼠腔注射 10% 水合氯醛 (0.25 mL/100 g) 进行麻醉, 麻醉后分离结肠, 留取距肛门 2 cm 至回盲部结肠标本, 用生理盐水冲洗结肠, 取 1 cm 用于组织病理学检测, 其余组织于 -80 ℃ 保存待用。用磷酸盐缓冲液将结肠组织冲洗干净后置于多聚甲醛溶液 (40 g/L) 固定, 常规石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 采用光学显微镜观察结肠组织切片, 以 Dieleman 的标准^[8] 进行组织病理学评分, 正常黏膜, 评分为 0; 基底隐窝缺损 < 1/3, 评分为 1; 基底隐窝缺损 $\geq$ 2/3, 评分为 2; 隐窝缺失, 仅余表面上皮, 伴炎症细胞浸润, 评分为 3; 黏膜糜烂、溃疡伴大量炎症细胞浸润, 评分为 4~5。

2.6 蛋白免疫印迹实验 取各组结肠组织适量充分研磨, 加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 离心 (14 000 $\times$ g) 15 min, 收集上清, 二喹啉甲酸 (BCA) 法测定细胞总蛋白浓度, 并将浓度调整至一致。各孔取 40 μ g 蛋白上样, 于 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (10% 分离胶和 5% 浓缩胶) 电泳进行蛋白分离 (电压 100 V, 2 ~ 2.5 min), 采用电转法 (300 mA 电流 60 ~ 90 min) 将蛋白转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用 TBST 洗膜, 加入一抗孵育 4 ℃ 反应过夜。次日先以 TBST 洗膜, 加入二抗孵育, 室温反应 1 h, 再用 TBST 洗膜, 增强化学发光法显色, 全自动凝胶成像仪采集图片。采用 Image J 图像分析管理系统对蛋白条带灰度值进行分析, 以 TRIL4、p-I κ B α 、I κ B α 、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65 与内参 β -actin 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析 使用 SPSS22.0 软件进行分析, 计量数据均通过正态性检验, 以 ($\bar{x} \pm s$) 描述; 多组间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 重复观测资料则行重复测量方差分析, 两两组间比较采用 LSD-*t* 检验, 两两时间比较采用差值 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠给药前后 DAI 评分的比较 给药前除正常对照组外, 其他各组大鼠 DAI 评分无差异 ($P > 0.05$), 并且均较正常对照组升高 ($P < 0.01$)。给药 1 周和 2 周时五味子甲素高剂量组大鼠 DAI 评分较中剂量组和小剂量组降低 ($P < 0.05$); 五味子甲素中剂量组大鼠 DAI 评分较低剂量组降低 ($P < 0.05$), 模型对照组和五味子甲素低剂量组大鼠 DAI 评分无差异 ($P > 0.05$); 给药 1 周和 2 周时美沙拉嗪组大鼠 DAI 评分较模型对照组降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.2 各组大鼠给药前后血清炎症因子水平的比较 给药前除正常对照组外, 其他各组大鼠血清 TGF- β 1、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平无差异 ($P > 0.05$); 模型对照组大鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平较正常对照组升高, TGF- β 1 和 IL-10 水平

表 2 各组大鼠给药前后 DAI 评分（分， $\bar{x}\pm s$ ， $n=8$ ）

组别	给药前	给药 1 周	给药 2 周
正常对照组	0.13±0.35	0.13±0.35	0.25±0.46
模型对照组	2.75±0.46 ^a	2.88±0.35 ^a	2.88±0.35 ^a
五味子甲素低剂量组	2.63±0.52 ^a	2.75±0.46 ^a	2.75±0.46 ^a
五味子甲素中剂量组	3.00±0.00 ^a	2.13±0.35 ^{abc}	1.88±0.35 ^{abc}
五味子甲素高剂量组	2.75±0.46 ^a	1.25±0.46 ^{abcd}	1.00±0.00 ^{abcd}
美沙拉嗪组	2.75±0.46 ^a	1.38±0.52 ^{ab}	1.25±0.46 ^{ab}

注：与正常对照组比较，^a $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^b $P<0.05$ ；与五味子甲素低剂量组比较，^c $P<0.05$ ；与五味子甲素中剂量组比较，^d $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠给药前后血清 TGF-β1 和 IL-6 水平（pg/mL， $\bar{x}\pm s$ ， $n=8$ ）

组别	TGF-β1			IL-6		
	给药前	给药 1 周	给药 2 周	给药前	给药 1 周	给药 2 周
正常对照组	37.63±4.71	34.61±5.02	37.07±4.07	24.76±2.53	24.54±3.24	23.22±6.68
模型对照组	13.53±3.50 ^a	15.31±2.32 ^a	12.49±2.71 ^a	94.60±5.07 ^a	91.61±6.11 ^a	94.32±5.04 ^a
五味子甲素低剂量组	14.23±2.40 ^a	15.71±3.12 ^a	13.79±2.39 ^a	92.93±6.45 ^a	87.97±6.47 ^a	88.23±5.87 ^a
五味子甲素中剂量组	13.46±2.99 ^a	20.01±2.70 ^{abc}	20.39±3.60 ^{abc}	91.46±6.88 ^a	82.62±6.56 ^{abc}	81.49±5.78 ^{abc}
五味子甲素高剂量组	14.79±2.76 ^a	25.60±3.22 ^{abcd}	24.69±4.16 ^{abcd}	92.28±4.94 ^a	68.23±6.02 ^{abcd}	64.63±6.82 ^{abcd}
美沙拉嗪组	14.33±3.30 ^a	18.86±3.84 ^{ab}	23.48±4.43 ^{ab}	90.17±4.86 ^a	73.04±8.11 ^{ab}	72.78±5.83 ^{ab}

注：与正常对照组比较，^a $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^b $P<0.05$ ；与五味子甲素低剂量组比较，^c $P<0.05$ ；与五味子甲素中剂量组比较，^d $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠给药前后血清 IL-10 和 TNF-α 水平（pg/mL， $\bar{x}\pm s$ ， $n=8$ ）

组别	IL-10			TNF-α		
	给药前	给药 1 周	给药 2 周	给药前	给药 1 周	给药 2 周
正常对照组	85.44±6.46	85.24±6.73	84.98±6.93	21.58±2.78	20.89±2.98	20.34±2.43
模型对照组	22.31±3.01 ^a	21.70±2.92 ^a	21.26±2.93 ^a	74.17±5.28 ^a	66.54±6.52 ^a	70.58±6.12 ^a
五味子甲素低剂量组	21.93±2.64 ^a	22.41±2.78 ^a	23.24±3.91 ^a	72.18±5.07 ^a	67.35±6.48 ^a	62.71±6.10 ^a
五味子甲素中剂量组	21.67±3.71 ^a	35.51±2.86 ^{abc}	44.28±4.71 ^{abc}	71.94±7.78 ^a	56.10±5.48 ^{abc}	46.52±4.59 ^{abc}
五味子甲素高剂量组	21.68±3.61 ^a	47.97±3.62 ^{abcd}	57.89±4.17 ^{abcd}	69.34±6.91 ^a	46.16±5.23 ^{abcd}	34.65±5.33 ^{abcd}
美沙拉嗪组	21.28±2.82 ^a	32.75±2.93 ^{ab}	49.46±5.37 ^{ab}	69.88±6.79 ^a	48.46±6.21 ^{ab}	39.27±6.69 ^{ab}

注：与正常对照组比较，^a $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^b $P<0.05$ ；与五味子甲素低剂量组比较，^c $P<0.05$ ；与五味子甲素中剂量组比较，^d $P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠肠道通透性的比较 给药 2 周时模型对照组大鼠尿液中乳果糖、L/M 比值较正常对照组升高，甘露醇较正常对照组降低（ $P<0.01$ ）；五味子甲素高剂量组大鼠尿液中乳果糖、L/M 比值均较中剂量组和小剂量组降低，甘露醇较中剂量组和小剂量组升高（ $P<0.05$ ）；五味子甲素中剂量组大鼠尿液中乳果糖、L/M 比值较低剂量组降

较正常对照组降低（ $P<0.01$ ）。给药 1 周和 2 周时五味子甲素高剂量组大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平较中剂量组和小剂量组降低，TGF-β1 和 IL-10 水平较中剂量组和小剂量组升高（ $P<0.05$ ）；五味子甲素中剂量组大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平较低剂量组降低，TGF-β1 和 IL-10 水平较低剂量组升高（ $P<0.05$ ）；而模型对照组和五味子甲素低剂量组大鼠 TGF-β1、IL-6、IL-10 和 TNF-α 水平无差异（ $P>0.05$ ）。给药 1 周和 2 周时美沙拉嗪组大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平较模型对照组降低，TGF-β1 和 IL-10 水平较模型对照组升高（ $P<0.05$ ）。见表 3~4。

低，甘露醇较低剂量组升（ $P<0.05$ ）；模型对照组和五味子甲素低剂量组大鼠尿液中乳果糖、甘露醇、L/M 比值无差异（ $P>0.05$ ）；美沙拉嗪组大鼠尿液中乳果糖、L/M 比值较模型对照组降低，甘露醇较模型对照组升高（ $P<0.05$ ）。见表 5。

表 5 各组大鼠给药 2 周时肠道通透性和结肠组织病理学评分（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=8$ ）

组别	乳果糖/%	甘露醇/%	L/M	组织学评分/分
正常对照组	0.21±0.04	5.62±1.47	0.04±0.01	0.13±0.35
模型对照组	3.13±0.28 ^a	1.85±0.15 ^a	1.63±0.21 ^a	4.88±0.35 ^a
五味子甲素低剂量组	3.04±0.26 ^a	1.97±0.17 ^a	1.58±0.26 ^a	4.88±0.35 ^a
五味子甲素中剂量组	2.20±0.17 ^{abc}	2.48±0.24 ^{abc}	0.92±0.17 ^{abc}	3.75±0.46 ^{abc}
五味子甲素高剂量组	1.16±0.12 ^{abcd}	3.86±0.29 ^{abcd}	0.32±0.09 ^{abcd}	2.13±0.35 ^{abcd}
美沙拉嗪组	1.57±0.15 ^{ab}	3.24±0.24 ^{ab}	0.48±0.11 ^{ab}	2.75±0.46 ^{ab}

注：与正常对照组比较，^a $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^b $P<0.05$ ；与五味子甲素低剂量组比较，^c $P<0.05$ ；与五味子甲素中剂量组比较，^d $P<0.05$ 。

3.4 各组大鼠给药 2 周时结肠组织病理学评分的比较 给药 2 周时模型对照组大鼠结肠病理学评分较正常对照组升（ $P<0.01$ ）；五味子甲素高剂量组大鼠结肠组织病理学评分

均较中剂量组和小剂量组降低（ $P<0.05$ ）；五味子甲素中剂量组大鼠结肠组织病理学评分较低剂量组降低（ $P<0.05$ ）；模型对照组和五味子甲素低剂量组大鼠结肠组织

病理学评分无差异 ($P>0.05$)；美沙拉嗪组大鼠结肠组织病理学评分较模型对照组降低 ($P<0.05$)。见表 5。

3.5 各组大鼠给药 2 周时结肠组织 TLR4、IkB α 、p-IkB α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白 给药 2 周时模型对照组大鼠结肠组织 TLR4、IkB α 、p-IkB α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白均正常对照组升高 ($P<0.01$)；五味子甲素高剂量组大鼠结肠组织 TLR4、IkB α 、p-IkB α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白均较中剂量组和低剂量组降低 ($P<0.05$)；

表 6 各组大鼠结肠组织中 TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、IkB- α 和 p-IkB- α 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	TLR4	NF- κ B p65	p-NF- κ B p65	IkB- α	p-IkB- α
正常对照组	0.16 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.02
模型对照组	0.79 $\pm$ 0.08 ^a	1.16 $\pm$ 0.13 ^a	0.92 $\pm$ 0.09 ^a	0.64 $\pm$ 0.08 ^a	0.42 $\pm$ 0.05 ^a
五味子甲素低剂量组	0.75 $\pm$ 0.09 ^a	1.07 $\pm$ 0.12 ^a	0.87 $\pm$ 0.10 ^a	0.59 $\pm$ 0.07 ^a	0.39 $\pm$ 0.06 ^a
五味子甲素中剂量组	0.61 $\pm$ 0.07 ^{abc}	0.85 $\pm$ 0.10 ^{abc}	0.75 $\pm$ 0.08 ^{abc}	0.47 $\pm$ 0.06 ^{abc}	0.31 $\pm$ 0.05 ^{abc}
五味子甲素高剂量组	0.42 $\pm$ 0.08 ^{abcd}	0.67 $\pm$ 0.11 ^{abcd}	0.61 $\pm$ 0.07 ^{abcd}	0.32 $\pm$ 0.05 ^{abcd}	0.19 $\pm$ 0.04 ^{abcd}
美沙拉嗪组	0.54 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.71 $\pm$ 0.12 ^{ab}	0.69 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.07 ^{abc}	0.24 $\pm$ 0.06 ^{ab}

注：与正常对照组比较，^a $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^b $P<0.05$ ；与五味子甲素低剂量组比较，^c $P<0.05$ ；与五味子甲素中剂量组比较，^d $P<0.05$ 。

4 讨论

传统中医药讲究论本而治，五味子甲素为五味子果实主要活性物质之一。已有研究^[9]显示，五味子甲素对三硝基苯磺酸诱导的小鼠溃疡性结肠炎有给药作用，作用机制可能与其抑制炎症因子 NO、IL-6 及 TNF- α 的产生有关。

本研究采用五味子甲素对大鼠实验性结肠炎的保护作用及机制进行进一步研究，结果显示，五味子甲素给药 1 周和 2 周时可剂量依赖性降低大鼠 DAI 评分，且给药 2 周时可剂量依赖性降低结肠组织病理学评分，说明五味子甲素对大鼠实验性结肠炎具有保护作用。

肠道黏膜在多种危险因素刺激下上皮屏障破坏，会导致肠组织的慢性炎症性反应而发生溃疡性结肠炎^[10]。IL-6 具有广泛生物活性的促炎细胞因子^[11]。TGF- β 是生长因子超家族中具有免疫负调控功能的一大类细胞因子家族^[12]。IL-10 维持肠道正常黏膜免疫平衡。TNF- α 参与溃疡性结肠炎的炎症反应和免疫应答。本研究结果显示，五味子甲素给药 1 周和 2 周时可剂量依赖性降低大鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平，升高大鼠血清 TGF- β 1 和 IL-10 水平，说明五味子甲素对大鼠实验性结肠炎的保护作用可能与其降低促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α ，升高抑炎细胞因子 TGF- β 1 和 IL-10 有关。

目前研究显示，溃疡性结肠炎的发病机制可能与肠道黏膜屏障功能减弱有关^[13-14]。L/M 值可间接且全面、准确地反映肠黏膜的通透性变化，L/M 值增大，说明溃疡性结肠炎肠通透性增高，肠屏障功能损害^[15]。本研究结果显示，五味子甲素给药 2 周时可剂量依赖性大鼠尿液中 L/M 比值，说明五味子甲素可降低大鼠肠道黏膜通透性，这可能是其发挥溃疡性结肠炎保护作用的机制。

NF- κ B 是各种致病因子释放和表达的关键^[16-17]，后续产生级联炎症反应，使炎症过程得以放大和持续，从而损伤肠黏膜，最终导致溃疡性结肠炎的发生^[18]。目前已知

五味子甲素中剂量组大鼠结肠组织 TLR4、IkB α 、p-IkB α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白均较低剂量组降低 ($P<0.05$)；模型对照组和五味子甲素低剂量组大鼠结肠组织 TLR4、IkB α 、p-IkB α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白无差异 ($P>0.05$)；美沙拉嗪组大鼠结肠组织 TLR4、IkB α 、p-IkB α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白较模型对照组降低 ($P<0.05$)。见表 6。

NF- κ B 的活化是溃疡性结肠炎发生发展的关键因素之一^[19]。本研究结果显示，五味子甲素给药 2 周时可剂量依赖性降低溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中蛋白表达水平，说明五味子甲素对大鼠溃疡组织 TLR4/NF- κ B 信号通路具有抑制作用，这可能是其发挥溃疡性结肠炎保护作用的机制。

五味子甲素对溃疡性结肠炎大鼠具有保护作用，可能与调控血清促炎和抑炎细胞水平，降低肠道黏膜通透性及抑制结肠组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路有关。

参考文献：

[1] Scaldaferrì F, Gerardi V, Lopetuso L R, *et al.* Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility[J]. *Bio Res Int*, 2013, 2013(2): 307-315.

[2] Conrad K, Roggenbuck D, Laass M W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(4-5): 463-466.

[3] 李 静, 陈卫刚. 肠道菌群给药溃疡性结肠炎的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(24): 4189-4192.

[4] Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, *et al.* Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1785-1794.

[5] Hou W, Gao W, Wang D, *et al.* The protecting effect of deoxyschisandrin and schisandrin B on HaCa T cells against UVB-induced damage[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127177.

[6] 徐志立, 陶小军, 张 莹, 等. 五味子甲素对大鼠及小鼠肠平滑肌功能的抑制作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(21): 126-129.

[7] Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, *et al.* Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2): 238-249.

[8] Dieleman L A, Palmen M J, Akol H, *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. *Clin ExpImmunol*, 1998, 114(3): 385-391.

[9] 梁晗业, 徐志立, 陶小军, 等. 五味子甲素对小鼠溃疡性结肠炎的给药作用[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(3): 38-42.

[10] 林安娜, 李雨晴, 钟慕晓, 等. 炎性细胞因子在溃疡性结肠炎患者中的表达及其对预后的影响[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(12): 1712-1717.

[11] 张宇翔, 张凯亚. 溃疡性结肠炎患者炎症黏膜中 PCT、IL-6、IL-23 水平的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(14): 3537-3538.

[12] 王琳, 裴玲燕, 柯愈诗, 等. 蒙药嘎日迪散对溃疡性结肠炎大鼠 Th1 细胞和 Th17 细胞的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(5): 399-404.

[13] Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, *et al.* Epithelial IL-18 equilibrium controls barrier function in colitis[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1444-1456.

[14] Alipour M, Zaidi D, Valcheva R, *et al.* Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2016, 10(4): 462-471.

[15] 王 慧, 毛晶磊, 吴艳敏, 等. 真人养脏汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道黏膜屏障功能的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(11): 2053-2059.

[16] 朱 磊, 沈 洪, 顾培青, 等. 黄芩苷对溃疡性结肠炎模型大鼠 NF- κ B 表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(5): 447-450.

[17] Rashidian A, Muhammadnejad A, Dehpour A R, *et al.* Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: the involvement of the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2016, 24(2-3): 109-118.

[18] 顾思臻, 薛 艳, 窦丹波. 溃结通对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎大鼠 IkB α /NF- κ B p65 信号通路磷酸化的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(2): 297-301.

[19] 史萍慧, 温 翔. 白头翁汤加减对急性期溃疡性结肠炎患者促炎因子及 NF- κ B mRNA 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(11): 2059-2061.

百合鸡子汤通过 BDNF/TrkB 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 CUMS 大鼠抗抑郁的影响

袁志鹰^{1,2}, 李 哲¹, 林美好¹, 李子仪¹, 陈乃宏^{1,3}, 刘 芳¹, 李 亮^{1*}
(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 中医心肺病证辨证与药膳食疗重点研究室, 湖南 长沙 410208; 3. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: **目的** 探究百合鸡子汤通过 BDNF/TrkB 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 CUMS 大鼠抗抑郁的影响。**方法** CUMS 法复制大鼠抑郁模型, 观察百合鸡子汤对大鼠抑郁行为学和前额叶皮质 BDNF/TrkB 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键蛋白表达的影响。**结果** 抑郁行为学的强迫游泳实验中, CUMS 组大鼠不动时间延长, 而百合鸡子汤组、氟西汀组大鼠抑郁行为均得到改善 ($P<0.01$)。Western blot 检测发现, CUMS 降低了大鼠前额叶皮质组织的 BDNF、p-TrkB、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 的表达, 而百合鸡子汤干预能够上调这些蛋白的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 百合鸡子汤具有一定的抗抑郁作用, BDNF/TrkB 及其下游的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可能为其作用机制。

关键词: 百合鸡子汤; 抑郁; PI3K/Akt/mTOR; BDNF/TrkB

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)03-0778-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.042

抑郁症是指以显著而持久的情绪低落、活动能力减退、思维与认知功能迟缓为主要临床特征的一类心境障碍慢性疾病, 近年来发病率逐年攀升^[1-3]。我国东汉医圣张仲景在《金匱要略》中对百合病、梅核气、奔豚气等病症的论述, 与现代医学对抑郁症的表述非常相似^[4]。

百合鸡子汤最早记载于《金匱要略》卷中, 为治疗百合病的系列经方之一。百合鸡子汤由百合、鸡子黄组方而成, 百合甘、微寒, 归心、肺经, 君以百合, 甘凉清肺、清心安神; 鸡子黄味甘性平, 归心、肾、脾经, 佐以鸡子黄救厥阴之阴, 安胃气, 胃为肺母, 胃安则肺气而令行。

收稿日期: 2020-03-20
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81403206); 湖南省自然科学基金青年项目 (2019JJ50446); 湖南省中医药科研计划课题项目 (202069, 202108); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2018CX03)
作者简介: 袁志鹰 (1986—), 男, 博士, 高级实验师, 从事中医药膳防治心脑血管疾病及中药质量控制研究。Tel: (0731) 88458227, E-mail: yuanzhiying2018@163.com
*** 通信作者:** 李 亮 (1981—), 男, 博士, 副教授, 从事中医诊断研究。Tel: (0731) 88458217, E-mail: superliliang@126.com