文章编号:1001-6880(2014)6-0952-05

黄芩苷对实验性结肠炎小鼠 TLRs/MyD88 通路的作用研究

邹　颖[1,2],迟宏罡[1],欧阳霖芮[3],石　敏[3],蔡碧茉[3],
伍俏璐[3],戴世学[4],冯锦山[1],赵　兵[1],郑学宝[1*]
[1]广东医学院第二临床医学院中医学教研室;[2]广东医学院中美肿瘤研究所;
[3]广东医学院药学院,东莞 523808;[4]南方医科大学南方医院急诊科,广州 510515

摘　要:本文研究黄芩苷对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎小鼠模型的疗效,并从 TLRs/MyD88 通路探讨其作用机制。C57BL/6 小鼠 24 只,分为空白对照组、模型组和黄芩苷组,用 3.5% DSS 诱导结肠炎模型,黄芩苷(30 mg/kg)干预 7 天,记录小鼠的疾病活动指数(DAI)评分,HE 染色观察病理改变并评分,检测结肠髓过氧化物酶(MPO)活性,ELISA 法检测肿瘤坏死因子(TNF)-α 和白介素(IL)-6 浓度,Real-time PCR 法检测 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 表达水平。结果显示黄芩苷能有效抑制结肠炎小鼠 DAI 评分、结肠组织病理学评分和 MPO 活性,降低 IL-6 和 TNF-α 表达,降低 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 的表达。表明黄芩苷能有效缓解 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型的症状,降低炎症反应,其作用机制可能是与 TLRs/MyD88 通路相关。

关键词:黄芩苷;炎症性肠病;TLRs/MyD88 通路
中图分类号:R965.1　　**文献标识码**:A

Baicalin Improves DSS-Induced Colitis in Mice Via the TLRs/MyD88 Signaling Pathway

ZOU Ying[1,2], CHI Hong-gang[1], OUYANG Lin-rui[3], SHI Min[3], CAI Bi-mo[3],
WU Qiao-lu[3], DAI Shi-xue[4], FENG Jin-shan[1], ZHAO Bing[1], ZHENG Xue-bao[1*]
[1]*Department of Traditional Chinese Medicine, The second clinical Medical College*; [2]*China-America Cancer Research Institute*;
[3]*Pharmaceutical Institute of Guangdong Medical College, Guangdong Dongguan 523808, China*;
[4]*Department of Emergency, Southern Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*

Abstract: The objective of this study was to elucidate whether baicalin reduces colonic inflammation in a mice colitis model through inhibition of the TLRs/MyD88 signaling pathway. C57BL/6 mice were randomized into control group, DSS group (administered with 3.5% DSS solution) and baicalin group (administered with 3.5% DSS solution and orally administered with baicalin, 30 mg/kg body weight). The disease activity index (DAI) score and histological score were evaluated. Myeloperoxidase activity was detected and colonic mucosal histological changes were observed by HE staining. The protein expression levels of Tumornecrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) levels in colonic tissue were determined by ELISA. The mRNA expression levels of TLR2, TLR4 and MyD88 in colonic tissue were detected by Real-time PCR. Compared with the DSS group, the baicalin-treated group showed significant decreases in DAI, histological score, myeloperoxidase activity, expressions levels of TNF-α protein, IL-6 protein, TLR2 mRNA, TLR4 mRNA and MyD88 mRNA. Collectively, these findings highlighted that baicalin had significant therapeutic effects on DSS-induced colitis and the anti-inflammatory actions of baicalin may involve inhibition of the TLRs/MyD88 signaling pathway.

Key words: baicalin; inflammatory bowel diseases; TLRs/MyD88 signaling pathway

炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克隆恩病(crohn's disease, CD)两种类型,是以侵及结肠黏膜且以溃疡为主的慢性非特异性炎性肠病,虽然病因和发病机制目前仍然未完全阐明,但易感个体体内的环境因素改变引发的肠道免疫系统对肠道正常菌群的免疫耐受失衡已得到广泛的认可[1,2]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)作为模式识别受

收稿日期:2013-08-21　　接受日期:2014-02-25
基金项目:国家自然科学基金项目(81173240);广东省自然科学基金项目(10152402301000003)
*通讯作者 Tel:86-769-22896613;E-mail:xuebaozheng@sina.com

体,在机体炎症反应中的固有免疫应答中起着非常重要的作用。近年来,大量的临床和实验研究证实 TLRs 在 IBD 患者和结肠炎动物模型中的表达都有显著的升高[3],提示 TLRs 在 IBD 的发病机制中发挥重要作用。TLRs 识别外源性配体或内源性分子后,可将识别信号传递给髓样细胞分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)接头蛋白,MyD88 再将该信号传递给核因子-κB(nuclear factor-kappa B,NF-κB)并引起 NF-κB 活化,释放炎症因子和趋化因子,促进炎症细胞的浸润而参与炎症反应[4]。因此,阻断 TLRs/MyD88 可缓解 IBD 肠道的炎症反应。

黄芩苷(baicalin)是唇形科植物黄芩的有效成分之一,其药理作用广泛,具有清热解毒、抗炎、利胆、降压、利尿、抗变态反应等多方面的作用[5]。近年来研究证实黄芩苷对实验性结肠炎小鼠具有一定的保护作用[6],但机制尚未完全明确。因此,本研究拟从 TLRs/MyD88 通路为出发点,深入探讨黄芩苷对结肠炎保护作用的机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

C57BL/6 小鼠(雌性,18 ~ 20 g),购于中山大学实验动物中心,动物合格证号:2007-0081。

1.2　实验试剂

黄芩苷(98%),购于西安源森生物科技公司,生产批号:YS121121;DSS 购于美国 MP Biomedicals 生物公司;Trizol、RNase inhibitor、RT(逆转录)试剂盒和 SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal 均购自美国 Invitrogen 公司;小鼠 IL-6 和 TNF-α ELISA 检测试剂盒购于美国 R&D 公司;髓过氧化物酶(MPO)活性检测试剂盒购于南京建成生物公司。

1.3　实验设计

C57BL/6 小鼠 30 只,随机分为 3 组:空白对照组($n = 10$)、模型组($n = 10$)和黄芩苷组($n = 10$)。空白对照组小鼠不做处理;模型组及黄芩苷组小鼠每日自由饮用 3.5% DSS 溶液,黄芩苷灌胃剂量为 30 mg/kg 体重,共 7 d;7 d 后处死全部小鼠,留取结肠组织 3 份,其中 1 份置于 10% 中性甲醛中保存,另外 2 份保存于-80 ℃冰箱中用于 Real-time PCR 和 ELISA 检测。

1.4　DAI 评分

实验期间观察并记录大鼠体质量、大便性状、血便情况,DAI = (体质量下降分数 + 大便性状分数 + 血便分数)/3;DAI 评分标准如下[7]:0 分,体质量无下降,大便性状正常,大便隐血阴性;1 分,体质量下降 1% ~ 5%,大便松散,大便隐血(+);2 分,体质量下降 5% ~ 10%,大便非常软但成形,可见肉眼血便(++);3 分,体质量下降 10% ~ 15%,大便性状为稀便,可见肉眼血便(+++),4 分,体质量下降 >15%,大便性状为较重稀便,可见肉眼血便(++++)。

1.5　结肠组织病理学评分

结肠组织在 10% 中性甲醛中固定 24 h 以上,组织脱水、包埋、切片,常规 HE 染色,电子显微镜下观察并根据 Neurath[8] 等的评分标准进行评分:0 分:未见明显病理改变;1 分:10% 高倍视野中,呈低水平淋巴细胞浸润,肠绒毛结构没有破坏;2 分,10% ~ 25% 高倍视野中,呈中等水平淋巴细胞浸润,肠隐窝加深,肠壁增厚但未侵及肌层,未见溃疡;3 分,25% ~ 50% 高倍视野中,呈高水平淋巴细胞浸润,血管增生,肠壁增厚并且侵及肌层,未见溃疡;4 分,明显淋巴细胞浸润,血管增生伴肠隐窝加深变形,肠壁增厚且侵及肌层,见溃疡。

1.6　结肠组织 MPO 活性检测

具体方法参照 MPO 活性检测试剂盒说明书操作。

1.7　结肠组织黏膜 IL-6 和 TNF-α 浓度检测

具体方法参照 ELISA 检测试剂盒说明操作。

1.8　Real-time PCR 法检测结肠组织 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 表达水平

结肠组织总 RNA 抽提按 Trizol 说明书进行,用分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度后,将 RNA 逆转录获取 cDNA。TLR2:上游引物,5′-TCCTGGCTCAAAAAGCAGTT-3′,下游引物,5′-ACATAGCCCACACCGTTCTC-3′;TLR4:上游引物,5′-TGGTTCACTGGAACACCAAA-3′,下游引物,5′-AGCAAGGGTCGAAGTTAGCA-3′;MyD88:上游引物,5′-TGGCCTTGTTAGACCGTGA-3′,下游引物,5′-AAGTATTTCTGGCAGTCCTCCTC-3′;β-actin:上游引物,5′-GACGGCCAGGTCATCACTATTG-3′,下游引物,5′-AGGAAGGCTGGAAAAGA-GCC-3′。PCR 反应条件:95 ℃,10 min,95 ℃,15 s,60 ℃,1 min,72 ℃,1 min,共 40 循环。实时荧光定量 PCR 数据结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法。

1.9 统计方法

实验结果采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量资料用均数(标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单向方差分析(one-way ANOVA),先对数据进行方差齐性检验,方差齐时多重比较采用 LSD 方法检验,如方差不齐时采用近似 F 检验 Welch 法进行方差分析,多重比较采用 Dunnett's T3 方法检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 一般情况及 DAI 评分

空白对照组小鼠反应较灵敏,毛发光泽,体重持续增长,大便正常,饮食正常。结肠炎模型组小鼠在 DSS 造模 3 天后逐渐出现精神萎靡、懒动,饮食减少,体毛失去光泽凌乱,体重明显减轻、稀便,肛周污秽,5 天后出现明显血便。黄芩苷治疗组小鼠未见明显的肉眼血便,症状明显轻于模型组小鼠;模型组小鼠的 DAI 评分逐渐升高,与空白对照组比较差异有显著意义,而黄芩苷治疗组小鼠的 DAI 水平明显低于模型组,黄芩苷组与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图 1)。

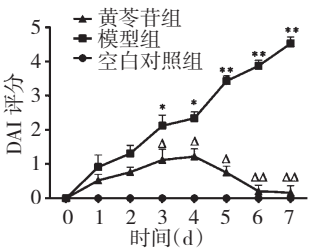

图 1 黄芩苷对实验性结肠炎小鼠 DAI 评分的影响

Fig. 1 Effects of baicalin on the DAI score of experimental colitis in mice

注:与空白对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.001$;与模型组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.001$。

Note: Compare with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.001$; Compare with DSS, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.001$.

2.2 结肠组织病理学评分

模型组小鼠与对照组相比,小鼠结肠黏膜不完整,病变累及结肠黏膜和黏膜下层,少数可达浆膜层,可见多灶性浅溃疡有出血和溃疡形成,炎性细胞浸润明显。黄芩苷治疗组小鼠结肠黏膜结构基本恢复正常,腺体破坏较轻,炎性细胞浸润程度较轻,病理组织学评分与模型组比较差异有显著意义($P<0.05$)(图 2 和图 3)。

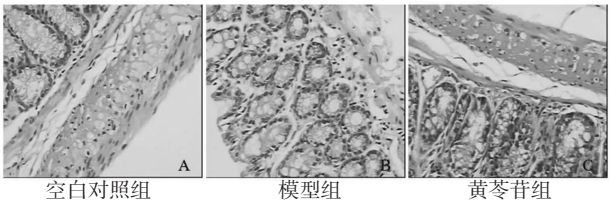

图 2 各组小鼠结肠组织 HE 染色(×200)

Fig. 2 HE staining of colonic tissues of all groups of mice (×200)

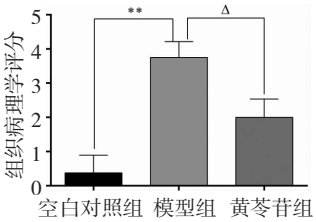

图 3 黄芩苷对实验性结肠炎小鼠结肠组织病理学评分的影响

Fig. 3 Effects of baicalin on the histological score of experimental colitis in mice

注:与空白对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.001$;与模型组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.001$。

Note: Compare with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.001$; Compare with DSS, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.001$.

2.3 MPO 活性

与空白对照组比较,模型组小鼠结肠组织 MPO 活性显著升高,差异有统计学意义($P<0.001$);黄芩苷可以有效的降低 MPO 的活性,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4)。

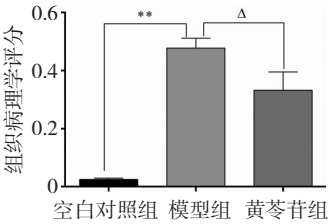

图 4 黄芩苷对实验性结肠炎小鼠结肠组织 MPO 活性的影响

Fig. 4 Effects of baicalin on the MPO activity of experimental colitis in mice

注:与空白对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.001$;与模型组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.001$。

Note: Compare with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.001$; Compare with DSS, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.001$.

2.4 结肠组织 IL-6 和 TNF-α 浓度表达水平

ELISA 结果显示,DSS 诱导结肠炎模型后,小鼠

结肠组织中 IL-6 和 TNF-α 的表达均显著升高,与空白对照比较差异有统计学意义($P<0.001$)(图 5A、B);黄芩苷能够抑制结肠炎小鼠结肠组织中 IL-6 的表达,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.001$)(图 5A),黄芩苷治疗组中的 TNF-α 的表达也得到有效的抑制,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图 5B)。

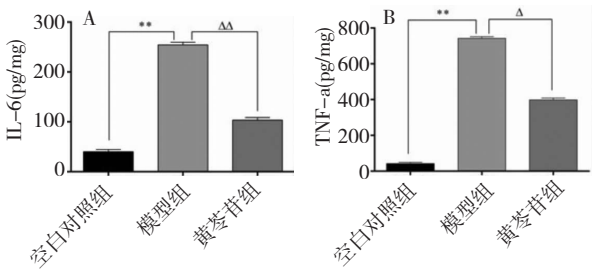

图 5　黄芩苷对实验性结肠炎小鼠结肠组织 IL-6 和 TNF-α 浓度的影响

Fig. 5　Effects of baicalin on the concentrations of IL-6 and TNF-α in colonic homogenates of experimental colitis in mice

注:与空白对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.001$;与模型组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.001$。

Note: Compare with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.001$; Compare with DSS, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.001$.

2.5　结肠组织 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 表达水平

Real-time PCR 结果显示,DSS 诱导的结肠炎小鼠模型中 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 表达水平显著升高,与空白对照组比较差异均有统计学意义($P<0.001$),黄芩苷治疗后,能够显著抑制 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 的表达,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图 6)。

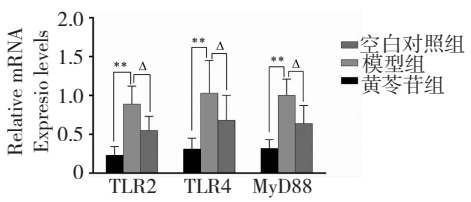

图 6　黄芩苷对实验性结肠炎小鼠结肠组织 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 表达水平的影响

Fig. 6　Effects of baicalin on the mRNA expression levels of TLR2, TLR4 and MyD88 in colon tissue of experimental colitis in mice

注:与空白对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.001$;与模型组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.001$。

Note: Compare with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.001$; Compare with DSS, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.001$.

3　讨论

本研究观察了黄芩苷对 DSS 诱导的实验性结肠炎小鼠模型的保护作用,并从 TLRs/MyD88 通路的角度探讨了黄芩苷的作用机制,实验结果证实黄芩苷能够缓解 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型的炎症反应,抑制结肠炎模型中 TLRs/MyD88 通路中过表达的 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 的水平。

DSS 诱导的结肠炎模型是一种经典的造模方法,其病理表现与人类的 UC 非常相似,本实验通过用黄芩苷进行治疗,结果显示黄芩苷能有效的缓解 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型的症状,降低腹泻和血便的程度,抑制肠道的炎症反应,降低 MPO 的活性,保护肠道黏膜,本实验结果也与刘萍等[6]的研究结果一致,提示黄芩苷对结肠具有一定的保护作用。TNF-α 和 IL-6 是重要的具有多种生物功能的促炎细胞因子,主要由激活的单核细胞和巨噬细胞产生,它们在肠道黏膜的炎症和免疫反应中起了非常重要的作用。在活动期 UC 患者的结肠黏膜组织 TNF-α 和 IL-6 的表达相对于缓解期患者或者正常人中的表达显著增多,被认为是公认的介导 IBD 的关键细胞因子,参与了 IBD 的发病[9]。我们的研究结果证实,DSS 诱导的结肠炎模型结肠黏膜中 TNF-α 和 IL-6 的表达升高,黄芩苷能有效的抑制结肠组织中 TNF-α 和 IL-6 的表达,说明黄芩苷能够抑制炎症因子的释放,从而限制炎症反应。

病原微生物及其细胞壁均具有一类称为病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMP)的特殊结构,TLR 就是通过识别 PAMP 介导宿主相关细胞因子的分泌和天然免疫应答的产生,称为模式识别受体。TLR2 可识别大部分现已发现的 PAMP 结构,脂蛋白类、脂磷壁酸酯类、肽多糖和酵母多糖等,TLR4 主要识别 LPS 及具有保守类脂 A 结构的衍生物等。研究发现在 IBD 患者和结肠炎动物模型中,TLR2 和 TLR4 的表达均显著升高,说明激活的 TLRs 信号通路参与了 IBD 的发病。我们的研究结果发现,在 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型的结肠组织中 TLR2 和 TLR4 的 mRNA 表达显著升高,TLR2 和 TLR4 的过表达可能是由于过度的固有免疫反应和肠道菌群的失衡引起的,因此促进的 IBD 的发生。

MyD88 是含有 TLR 结构域的接头蛋白,是 TLR 信号通路的下游信号因子,在 TLR 信号通路中有关键性的作用。TLRs 识别 PAMPs 后,胞质中 Toll 的 TLR 结构域与 MyD88 羧基末端相互作用,可引起 NF-κB. 的激活和转位,促使炎性细胞因子的合成与释放,从而诱发机体本身的炎症反应。研究发现在结肠炎小鼠模型中敲除 TLR4 和 MyD88 基因,小鼠可表现出死亡率降低、受损黏膜的自动修复、肠道出血程度减轻等症状[10],说明抑制 MyD88 通路可以功能性的限制肠道的炎症反应。我们的研究结果证实,黄芩苷能够有效的抑制 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型结肠黏膜 TLR2 和 TLR4 和 MyD88 mRNA 的表达,提示黄芩苷能够通过对 TLRs/MyD88 通路的调控来达到抑制结肠的炎症反应起到治疗作用的。

综上所述,本研究结果证实黄芩苷能够有效的缓解 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型的症状,降低炎症反应,其作用机制可能是与 TLRs/MyD88 通路相关。

参考文献

1 Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*, 2011, 3: 293-302.

2 Clavel T, Haller D. Bacteria-and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: Implications for chronic inflammation. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 9: 1153-1164.

3 Steenholdt C, Andresen L, Pedersen G, *et al*. Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2009, 2: 195-204.

4 Liu LQ(刘丽琼), Nie K(聂奎), Yu J(余姣), *et al*. Expression and significance of TLR2, 4/MyD88 pathway molecules mRNA in colonic mucosa of mice model with induced acute colitis. *Feed Rev*(饲料博览), 2012, 3: 5-9.

5 Zhang XP(张喜平), Tian H(田华), Cheng QH(程琪辉), *et al*. The current situation in pharmacological study on baicalin. *Chin Pharm Bull*, 2003, 11: 1212-1215.

6 Liu P(刘萍), Cheng H(程虹), Wu DF(吴东方). The protective effects of baicalin on experimental colitis in mice. *Chin Hosp Pharm J*, 2010, 19: 1623-1625.

7 Madsen KL, Malfair D, Gray D, *et al*. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis*, 1999, 4: 262-270.

8 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, *et al*. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*, 1995, 5: 1281-1290.

9 Mitsuyama K, Sasaki E, Toyonaga A, *et al*. Colonic mucosal interleukin-6 in inflammatory bowel disease. *Digestion*, 1991, 2: 104-111.

10 Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity*, 2006, 2: 319-329.

(上接第 951 页)

7 Sun YS, Hye SK, Hyeon JS, *et al*. Isolation and identification of flavonoids from Gujeolcho (*Chrysanthemum zawadskii* var. latilobum) as inhibitor of histamine release. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21: 613-617.

8 Marumoto S, Miyazawa M. Microbial reduction of coumarin, psoralen, and xanthyletin by *Glomerella cingilata*. *Tetrahedron*, 2011, 67: 495-500.

9 Chimichi S, De Sio F, Donati D, *et al*. The preparation of coumaric acids via styrylisoxazoles. *Heterocycle*, 1983, 20: 263-267.

10 Bao BQ, Zhang P, Lee YM, *et al*. Monoindole alkaloids from a marine sponge *Spongosorites* sp.. *Mar Drugs*, 2007, 5: 31-39.

11 Zhou HF, Jian RJ, Kang J. Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 12717-12721.

12 Zhang NL(张嫩玲), Hu JM(胡江苗), Liu YQ(刘玉清). Chemical constituents from *Albizia mollis*. *Zhongcaoyao* (中草药), 2010, 41: 1075-1078.

13 An LJ, Guan S, Shi GF, *et al*. Protocatechuic acid from Alpinia oxyphylla against MPP^+-induced neurotoxicity in PC-12 cells. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44: 436-443.

14 Li CT, Zhang WP, Fang SH, *et al*. Baicalin attenuates oxygen-glucose deprivation induced injury by inhibiting oxidative strss-imdiated 5-lipoxygenase activation in PC12 cells. *Acta Pharm Sin*, 2010, 31: 137-144.

15 Guan S, Bao YM, Jiang B, *et al*. Protective effect of protocatechuic acid from *Afpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Euro J Pharmacol*, 2006, 538(1-3): 73-79.