

复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 p - p38MAPK、CK2 表达的影响

陆文洪, 罗雯鹏, 王真权

(湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙, 410005)

[摘要] 目的:探讨复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠 p38MAPK 通路的影响及可能的作用机制。方法:将 80 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、阻断剂组和中药组,每组各 20 只。对除正常组外的其余组大鼠采用 TNBS 法制备溃疡性结肠炎大鼠模型,造模 2 周后各组分别予相应药物进行灌胃,采用免疫组化法检测结肠组织中 p - p38MAPK、CK2 的表达。结果:与正常组比较,模型组、阻断剂组、中药组中 p - p38MAPK、CK2 的表达水平明显升高,差异具有统计学意义 ($P > 0.01$);与模型组比较,阻断剂组、中药组中 p - p38MAPK、CK2 的表达水平明显降低,差异具有统计学意义 ($P > 0.01$);阻断剂组与中药组 p - p38MAPK、CK2 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论:复方芩柏颗粒剂可能是通过抑制相关蛋白 CK2 的表达以弱化 p38MAPK 通路来发挥对溃疡性结肠炎的治疗作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎;大鼠;复方芩柏颗粒剂;p - p38MAPK;CK2;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.065

Effect of compound Qinbo granules on the expression of phosphorylated p38 mitogen - activated protein kinase and CK2 in colonic mucosa in rats with ulcerative colitis

LU Wen - hong, LUO Wen - peng, WANG Zhen - quan

(The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of compound Qinbo granules on the p38 mitogen - activated protein kinase (p38MAPK) pathway in rats with ulcerative colitis and related mechanism of action. Methods: A total of 80 Sprague - Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, antagonist group, and traditional Chinese medicine (TCM) group, with 20 rats in each group. All rats except those in the normal group were used to establish a rat model of ulcerative colitis using 2,4,6 - trinitrobenzene sulfonic acid, and at 2 weeks after the model was established, the drugs were given by gavage. Immunohistochemistry was used to measure the expression of phosphorylated p38MAPK (p - p38MAPK) and CK2 in the colonic tissue. Results: The model group, the antagonist group, and the TCM group had significant increases in the expression of p - p38MAPK and CK2, as compared with the normal group ($P > 0.01$). Compared with the model group, the antagonist group and the TCM group had significant reductions in the expression of p - p38MAPK and CK2 ($P > 0.01$). There were no significant differences in the expression of p - p38MAPK and CK2 between the antagonist group and the TCM group ($P > 0.05$). Conclusion: Compound Qinbo granules exert a therapeutic effect on ulcerative colitis possibly by inhibiting the expression of CK2 and the p38MAPK pathway.

Key words: ulcerative colitis; rat; compound Qinbo granules; phosphorylated p38 mitogen - activated protein kinase; CK2; experimental study

溃疡性结肠炎是一种原因不明的肠道慢性非特异性炎症性疾病,病变主要位于结肠黏膜层,以结肠黏膜性炎症和溃疡为主要病理特点。中医学将本病归纳为“泄泻”范畴,其病位在于肠间,病因与中医水液代谢障碍密切相关。本研究复制大鼠溃疡性结肠炎模型,采用复方芩柏颗粒剂干预治疗,探索其对模型大鼠 p38MAPK 通路的影响及可能的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 健康成年 SD 大鼠,80 只,体质量 200 ~ 230g,清

洁级,雌雄各半,均由湖南中医药大学动物实验中心提供。

1.2 药物 16% 复方芩柏颗粒剂溶液(本院药剂科制备); p38MAPK 阻断剂 SB203580 (Calbiochem 公司,将 SB203580 溶解于 DMSO 中,每只大鼠按 1.5mg/kg 体质量计算 SB203580 用量)。5% 三硝基苯磺酸(TNBS, Sigma); 无水乙醇(分析纯,汕头市光华化学厂);免疫组化试剂盒(晶美生物工程有限公司);p38 磷酸化检测试剂盒等。

1.3 仪器 FA104 型电子天平;凝胶图像分析系统(北京

基金项目:湖南省中医药管理局资助项目(编号:201655)

第一作者:陆文洪,男,医学硕士,医师,研究方向:肛肠疾病的中医药防治

通讯作者:王真权,男,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:肛肠疾病的中医药防治, E - mail: wenfengwushang@qq.com

六一);光学显微镜(Olympus)等。

2 实验方法

2.1 动物分组 全部实验大鼠随机编号后常规饲养 1 周,随机选取 20 只为正常组,其余 60 只进行模型制备,造模成功后,采用随机数字表法分为模型组、阻断剂组和复方芩柏颗粒剂组(中药组),每组 20 只。

2.2 模型制备 参照吴小庚等^[1]方法建立溃疡性结肠炎大鼠模型。方法:先用 10%的水合氯醛(3mL/kg 剂量)使大鼠轻微麻醉,用 300mL/L 乙醇液将 TNBS 配置成 50g/L 溶液,而后用石蜡油将一直径 2mm、长约 12mm 的硅胶输液管充分润滑,轻缓插入大鼠肠腔内,进入深度约 8mm,继而把 TNBS 溶液一次性注入,最后提起大鼠尾部,另一只手捏紧其肛门,为了使造模剂充分渗透至大鼠肠腔内,需将其持续倒置约 5min。造模后,使动物保持平躺,自然清醒,自由饮食。在同一操作条件下,正常组大鼠肠腔内注入等体积 0.9%氯化钠注射液。

2.3 给药方法 正常组与模型组在造模 2 周后予蒸馏水 2mL 灌肠,每天 1 次,连续 3 周;中药组造模 2 周后予 16%芩柏颗粒溶液 2mL 灌肠,每天 1 次,连续 3 周;阻断剂组在每天以复方芩柏颗粒溶液灌肠(方法剂量同中药组)前 30min 经尾静脉注射 p38 MAPK 阻断剂 SB203580,每天 1 次,连续 3 周。

2.4 观察指标 免疫组化法检测各组大鼠结肠组织中 p-p38MAPK、CK2 的表达水平。仔细记录平均每 1000 个细胞中的平均光密度及阳性细胞个数。阳性细胞个数及平均光密度值越高表明细胞内阳性反应产物含量越高,反之则细胞内阳性反应产物含量越低。运用显微镜成像及图象分析系统计算分析得出结果。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理,所有实验研究测量相关数据运用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式呈现,通过单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

各组结肠黏膜组织 p-p38MAPK、CK2 的平均光密度值及阳性细胞个数比较:与正常组比较,阻断剂组、模型组、中药组中 p-p38MAPK、CK2 的表达水平均明显升高,差异具有统计学意义;与模型组比较,中药组、阻断剂组中 p-p38MAPK、CK2 的表达水平均显著降低,差异具有统计学意义,提示阻断剂 SB203580 和复方芩柏颗粒均可以显著降低溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜组织中 p-p38MAPK、CK2 的表达;中药组、阻断剂组 p-p38MAPK、CK2 表达水平比较,差异无统计学意义,提示中药组、阻断剂组在降低结肠黏膜组织中 p-p38MAPK、CK2 的表达方面无明显差异。(见表 1)

4 讨 论

溃疡性结肠炎是一种原因未明的自身免疫系统性疾病,多数学者认为该病与遗传、环境、肠道菌群、水液代谢、免疫等诸多因素有关^[2]。本课题组已进行的相关前期研究证实复方芩柏颗粒剂可以促进和提高结肠黏膜组织 AQP4、AQP8、NF-κB p65 的激活和表达,促进结肠黏膜组织参与

表 1 各组结肠黏膜组织 p-p38MAPK、CK2 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-p38MAPK		CK2	
		平均光密度	阳性细胞个数	平均光密度	阳性细胞个数
正常组	20	0.22±0.08	6.08±7.55	0.28±0.08	48.08±5.15
模型组	20	0.47±0.07 ^a	74.80±10.25 ^a	0.49±0.08 ^a	88.90±10.25 ^a
阻断剂组	20	0.29±0.06 ^b	47.23±11.25 ^b	0.34±0.07 ^b	58.83±12.25 ^b
中药组	20	0.31±0.07 ^{bc}	48.02±14.37 ^{bc}	0.33±0.06 ^{bc}	61.02±10.47 ^{bc}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与阻断剂组比较,^c $P > 0.05$ 。

水液代谢,缓解溃疡性结肠炎模型大鼠症状^[3]。有研究^[4]认为肠道黏膜免疫-炎症反应的异常在本病的发病中占着非常重要的地位,而 p38MAPK 与炎症反应调控密切相关,且与炎症的程度正相关。结肠炎症因子激活 p38MAPK 信号通路,通过级联反应,磷酸化,进而活化 CK2 促进抑制因子 IκB-α 的磷酸化和泛素化,调节 AQP 的蛋白和基因表达。同时,激活的 p38MAPK 信号转导通路又会继续产生大量 TNF-α,进一步推动 p38MAPK 信号通路的活化,形成正反馈循环。p-p38MAPK 作为 p38MAPK 的磷酸化产物,是 p38MAPK 信号通路的活化标志,具有广泛的生物学活性,它的表达情况与病情严重程度的呈正相关。而 CK2 作为 p38MAPK 信号通路下游的相关蛋白的表达同样反映了溃疡性结肠炎结肠 p38MAPK 信号通路激活的结果。故探讨复方芩柏汤颗粒剂是否可能通过 p38MAPK 信号通路调节溃疡性结肠炎大鼠水液代谢,为治疗溃疡性结肠炎提供了中医水液代谢障碍理论上的新的思路与方向,为中医药治疗溃疡性结肠炎的深层次的作用机制研究拓宽了领域。

本研究结果显示,TNBS 所致的溃疡性结肠炎模型大鼠结肠黏膜组织中,p-p38MAPK、CK2 的表达水平均明显增高,提示本病的发病与水通道蛋白通路密切相关。结果表明:复方芩柏汤颗粒剂保留灌肠能一定程度地抑制溃疡性结肠炎模型大鼠 p38MAPK 信号通路的活性,减轻结肠黏膜组织的炎症损伤,促进结肠黏膜组织参与水液代谢。我们推测复方芩柏汤颗粒剂治疗溃疡性结肠炎可能是通过阻断 p38MAPK 信号通路以调节水液代谢相关蛋白 CK2 表达的到来发挥对溃疡性结肠炎治疗作用。本实验结果为该方的后期研发提供了理论依据和指导。

参考文献

[1] 吴小庚,王爱磊,张学明,等. 实验性溃疡性结肠炎大鼠模型的建立[J]. 河北医药,2011,33(4):493-494.
[2] 孙芳美. 溃疡性结肠炎发病机制与治疗进展[J]. 中国医药指南,2012,10(12):445-446.
[3] 贺荔枝,尹明,王真权,等. 复方芩柏颗粒剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 AQP4、AQP8 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(5):13-16.
[4] Filcchi C. inflammatory bowel disease;new insights into mechanisms of inflammation and increasingly customized approaches to diagnosis and therapy[J]. Curr Gastroenterol,2004,20(4):209-310.

(收稿日期:2017-10-27)