

黄芩汤调控 Nrf2 通路对溃疡性结肠炎大鼠氧化应激作用的影响

马旭冉¹, 王彦礼¹, 邹迪新¹, 刘佳星¹, 宋红新¹, 杨伟鹏^{1*}, 李 或^{2*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 研究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠的氧化应激作用的影响, 探讨其抗氧化作用机制。经中国中医科学院中药研究所伦理委员会审议同意后, 运用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic, TNBS) 联合乙醇造模法建立大鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 模型, 将 SD 大鼠按体重随机分为正常组、模型组、柳氮磺吡啶组 (salazosulfapyridine, SASP, 0.5 g·kg⁻¹)、黄芩汤高、中、低剂量组 (20、10、5 g·kg⁻¹)。连续给药 5 天后, 取血清以及结肠组织, 生化法检测大鼠血清中过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-px)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性, ELISA 法测定大鼠血清中过氧化脂 (lipid peroxide, LPO) 的浓度, 免疫组织化学法观察核因子 E₂ 相关因子 Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) 的阳性表达, 利用 Western blot 技术检测 Nrf2 下游抗氧化酶血红素氧化酶 1 (heme oxygenase, HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1, NQO-1) 的蛋白表达。与正常组相比, 模型组血清 SOD、CAT、GSH-px 活性均有显著性下降, 而模型组血清 MPO 活性有显著性增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与模型组相比, 黄芩汤高、中剂量组中 CAT 的活性增加有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 黄芩汤高、中、低剂量组中 GSH-px 活性均显著增加 ($P < 0.05$); 与正常组相比, 模型组血清中 LPO 的含量显著升高 ($P < 0.01$), 而与模型组相比, 黄芩汤高、中剂量组均能显著降低 LPO 的含量 ($P < 0.05$); 免疫组化检测发现, 阳性药柳氮磺吡啶组与黄芩汤高剂量组 Nrf2 表达有统计学意义 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示, 与模型组相比, 黄芩汤各给药组与柳氮磺吡啶组均能够增加组织内 HO-1 和 NQO1 的表达, 并且呈现一定的剂量依赖关系。黄芩汤具有显著的抗氧化应激作用, 能明显改善 UC 大鼠的体征、精神状况及排便情况, 其对于 UC 的治疗作用机制可能与激活 Nrf2 通路, 增加 HO-1、NQO-1 等 II 相代谢酶的表达, 降低血清中 LPO、MPO 的含量, 增强 SOD、CAT、GSH-px 的活性有关。

关键词: 黄芩汤; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; Nrf2; 作用机制

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)04-0653-07

The effects of Huangqin Tang on oxidative stress and ulcerative colitis in rats through the Nrf2 signal pathway

MA Xu-ran¹, WANG Yan-li¹, ZOU Di-xin¹, LIU Jia-xing¹, SONG Hong-xin¹, YANG Wei-peng^{1*}, LI Yu^{2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effect of Huangqin Tang (HQT) on oxidative stress associated with ulcerative colitis in rats, and to explore its antioxidant mechanism. After approved by Institute of Chinese Materia Medica Ethics Committees in China Academy of Chinese Medical Sciences, the rats were given 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic (TNBS)/ethanol mixture to induce the ulcerative colitis (UC), and were randomly divided into normal group, model group, the salazosulfapyridine (SASP) group, and high, middle or low dose (20, 10, 5 g·kg⁻¹)

收稿日期: 2018-10-16; 修回日期: 2018-11-16.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273662, 81473592); 国家重大新药创制专项资助项目 (2014ZX09304306-006).

*通讯作者 Tel: 86-10-64093014, E-mail: hrbywp@sina.com;

Tel: 86-10-64286374, E-mail: liyubeijing1973@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0937

of HQT groups. After 5 days of treatment, the activity of catalase (CAT) from micrococcus lysodeikticus, glutathione peroxidase (GSH-px), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) were detected by biochemical assays. The levels of lipid peroxide (LPO) were detected by ELISA. The positive protein expression of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) were detected by immunohistochemistry method and the downstream antioxidant enzymes of Nrf2 were determined by Western blot analyses. The levels of SOD, CAT and GSH-px activities in the normal group were significantly higher than the model group, while the serum MPO activity in the model group was obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, there was a significant difference in the activity of CAT in the high and middle dose groups of HQT ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the activity of GSH-px in the high, middle and low dose groups of HQT were apparently higher than the model group ($P < 0.05$); The serum levels of LPO in the model group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$), while the up-regulating effects on LPO were reversed by the high and middle dose groups of HQT ($P < 0.05$). The expression of Nrf2 in the high-dose group of HQT and SASP group was statistically significant ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that compared with the model group, each of the HQT and SASP group could increase the heme oxygenase (HO-1) and NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) expression in a dose-dependence manner. HQT has significant anti-oxidative stress and obviously improves the signs, mental status and defecation of UC rats. The mechanism of action for HQT maybe related to activate the Nrf2 pathway and increase the expression of II phase metabolic enzymes such as HO-1 and NQO-1, reduce the content of LPO and MPO in serum and enhance the activity of SOD, CAT and GSH-px.

Key words: Huangqin Tang; ulcerative colitis; oxidative stress; Nrf2; action mechanism

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因尚不十分清楚的慢性非特异性结肠炎症, 具有多层次、多变量等复杂病性^[1]。病理改变以结肠溃疡糜烂为主, 具有弥散性、浅表性、连续性的特点, 病程漫长, 伴反复发作^[2]。目前多认为, 溃疡性结肠炎与遗传、感染、环境、饮食、免疫等多方面因素有关^[3]。近年来, 溃疡性结肠炎的发病趋势日益严重, 研究其作用机制对于临床治疗具有积极的指导意义。在本课题组对溃疡性结肠炎的前期研究中发现, 溃疡性结肠炎的发病机制除了与炎症密切相关外, 还可能与氧化应激有关^[4,5]。Nrf2 通路是目前发现的抗氧化应激反应的重要防御信号通路, 能够调控下游多种抗氧化酶和 II 相解毒酶的表达^[6]。本实验通过观察黄芩汤对 UC 大鼠结肠组织核因子 E₂ 相关因子 Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2)、血红素氧化酶 1 (heme oxygenase, HO-1)、氧化还原酶 1 (NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1, NQO-1) 以及细胞因子的检测, 探讨其治疗 UC 的作用机制。

材料与方 法

仪器 电子天平 (上海天平仪器厂)、TY-80A/S 脱色摇床、Varioskan Flash 全波长扫描多功能酶标仪 (赛默飞世尔科技有限公司)、美国 Bio-Rad 电泳仪 (Kigen 公司)、J-30I Beckman 高速离心机 (美国 Beckman 公司)、GL-8B 涡旋混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、XDS-1B 倒置显微镜 (重庆光电仪器有限公司)、

轮转式病理切片机 (深圳市汇沃科技有限公司)。

动物 健康 SD 雄性大鼠, SPF 级, 体重 180~200 g, 由中国食品药品检定研究院提供, 许可证号: SCXK (京) 2014-0013。饲养环境保持温度 (23±1.5) °C, 相对湿度 (45±15) %。实验方案经中国中医科学院中药研究所伦理委员会审议同意并批准。

药品与试剂 黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)、芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall)、炙甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)、大枣 (*Ziziphus jujuba* Mill) 购自北京同仁堂公司, 经中国中医科学院中药研究所李先端研究员鉴定后, 储存于本实验室。参照《伤寒论》组方及课题组的前期研究^[7], 黄芩汤的制备由黄芩、芍药、甘草和大枣配伍而成, 按照 3:2:2:2 的比例, 称取一定量的药材, 加药材总重量 10 倍体积的水, 煎煮 1 h 后, 趁热过滤药液; 药渣加 8 倍体积的水继续煎煮 1 h, 合并两次药液, 浓缩成 1 g·mL⁻¹ 药液。其质量经指纹图谱相似度和多成分含量分析控制, 提取率约为 36%, 与对照图谱相似系数为 0.998, 主要含黄酮和萜类化合物, 其中主要成分质量分数黄芩苷为 10.094%, 汉黄芩苷为 2.334 3%, 千层纸素 A-苷为 0.953 3%, 黄芩素为 0.411 4%, 汉黄芩素为 0.149 8%, 千层纸素 A 为 0.093 8%, 甘草素二糖苷为 0.790 6%, 甘草苷为 0.344 4%, 异甘草素二糖苷为 0.036 1%, 甘草素为 0.032 2%, 异甘草苷为 0.060 7%, 异甘草素为 0.003 5%。

柳氮磺胺吡啶 (salazosulfapyridine, SASP) 肠溶片 (批号: 20130506, 上海中西三维药业有限公司), 2,4,6-

三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic, TNBS, Sigma 公司), 过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-px)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (南京建成生物科技有限公司), 免疫组化及 DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), 兔抗鼠 Nrf2 单克隆抗体、兔抗鼠 HO-1 单克隆抗体、兔抗鼠 NQO-1 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司)。

模型制备及分组 采用 Morris 等^[7]报道的方法制备溃疡性结肠炎大鼠模型。将 Wistar 大鼠 60 只, 禁食不禁水 24 h, 用 1% 戊烷巴比妥钠腹腔麻醉 (4 mg/100 g) 后, 一次性将 TNBS (100 mg·kg⁻¹) 和 50% 乙醇溶液 0.25 mL 用直径 2 mm、长 15 cm 左右的 14 号导尿管缓缓注入大鼠距肛门约 8 cm 深的肠腔内, 捏紧肛门, 倒置数分钟。正常组 10 只大鼠采用同样方法灌以等体积的生理盐水, 术后常规饲养。

造模适应两天后, 将大鼠按体重随机分为正常组、模型组、阳性药 SASP 组、HQT 高、中、低剂量组, 造模 3 天后开始给药, HQT 高、中、低组分别按 20、10、5 g·kg⁻¹ 灌胃给药, 阳性药 SASP 组按 0.5 g·kg⁻¹ 剂量灌胃给药, 正常组和模型组给予等量的生理盐水, 每日给药 1 次, 连续给药 5 天。

样品采集 第 5 天灌胃给药后禁食不禁水 24 h, 眼眶取血, 以 3 500 r·min⁻¹ 转速离心 15 min, 分离血清, 置 -20 °C 冰箱冷冻保存。取血完毕后处死大鼠, 取出距肛门 8 cm 处结肠组织, 沿肠系膜缘剪开肠腔, 用生理盐水冲洗肠内容物, 一部分石蜡包埋进行常规病理切片及免疫组化染色, 另一部分放入 -80 °C 保存。

指标检测及方法

行为学指标 造模前后及给药期间观察大鼠体征、饮食及精神状况。

生化法检测 取上述分离后血清, 按照试剂盒使用说明, 用生化仪测定血清中 CAT、MPO、GSH-px、SOD 含量。

ELISA 法检测 取上述分离后血清, 按照试剂盒使用说明, 用酶标仪测定血清中过氧化脂 (lipid peroxide, LPO) 含量。

免疫组化染色 各组结肠组织按常规包埋, 切片, 厚度 4 μm。采用 S-P 法检测大鼠结肠组织中核因子 Nrf2 蛋白表达。结肠组织用中性甲醛固定 24 h 后, 常规脱水、浸蜡、包埋、切片, 然后常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 采用复合消化液和抗原修复液进行抗原修复, PBS 洗 3 次, 用 3% H₂O₂ 溶液孵育 10 min (去除内源性过氧化氢酶活性), 滴加 1:80 浓度的兔抗鼠 Nrf2 单

克隆抗体, 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次, 滴加聚合 HRP 标记抗兔 IgG 37 °C 孵育 50 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 常规脱水, 用中性树脂封片。每张切片在高倍镜下 (400×) 随机选取 4 个视野, 以出现棕黄色染色为阳性信号, 检测 Nrf2 积分光密度, 得到阳性样品数。

Western blot 法检测 取结肠组织, 剪碎, 加入 RIPA 裂解液以及 PMSF, 提取总蛋白质, 测定蛋白质含量。加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜, HO-1 一抗以 1:1 000 5% 的 BSA 稀释, NQO-1 一抗以 1:200 5% 的 BSA 稀释一抗, 孵育过夜, HRP 标记的二抗 (1:5 000) 孵育 2 h, 显影, 用 Image J 图像分析图像, 进行目的条带灰度值分析。

统计学方法 数据均用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据间比较采用 one-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异极具统计学意义。

结果

1 行为学结果

大鼠造模第 1 天后体重明显减轻, 第 2 天后体重均有所增加, 组间无明显差异, 但正常组体重明显高于其他组。正常组大鼠仅在第 1 天精神稍萎靡、懒动, 毛发晦暗稍显光泽, 便硬无明显变化, 第 2 天后即开始恢复正常, 体重持续上升; 而模型组即出现不同程度的便血、便秘浓黏、毛发晦暗无光泽, 给药后, SASP 组和黄芩汤组上述指标出现不同程度的减轻, 大鼠饮食及体重统计结果如图 1。

2 病理学检查结果

肉眼观察大鼠结肠组织: 正常组大鼠结肠外观正常, 未见充血, 颜色正常, 浆膜面、黏膜面和肌层未见有明显病变。模型组大鼠部分结肠内明显充血、瘀血, 肠黏膜颜色褐色, 肠黏膜及肌层明显变薄, 粪便有节段性充满肠道, 部分味恶臭。阳性药组大鼠结肠内未见明显充血、瘀血, 病变明显减轻。黄芩汤 3 个不同剂量组大鼠结肠未见明显充血、瘀血, 肠颜色及肌层厚度与模型组相比有不同程度减轻。

溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 HE 染色结果见图 2。正常组大鼠黏膜完整, 黏膜下未见有炎症现象, 肌层结构正常。模型组大鼠结肠黏膜和直肠均有炎症, 细胞排列紊乱, 部分结肠腺体消失被浸润的炎症细胞替代, 以单核细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞代替了正常细胞, 个别黏膜层明显变薄, 个别肌层组织炎症较重, 失去了正常结构。阳性药组大鼠结肠和直肠黏膜炎症浸润, 肠腺溃疡, 与模型组相比病变明显减轻。黄芩汤 3 个不同剂量组结肠和直肠黏膜炎症浸润, 肠腺溃疡, 肌层

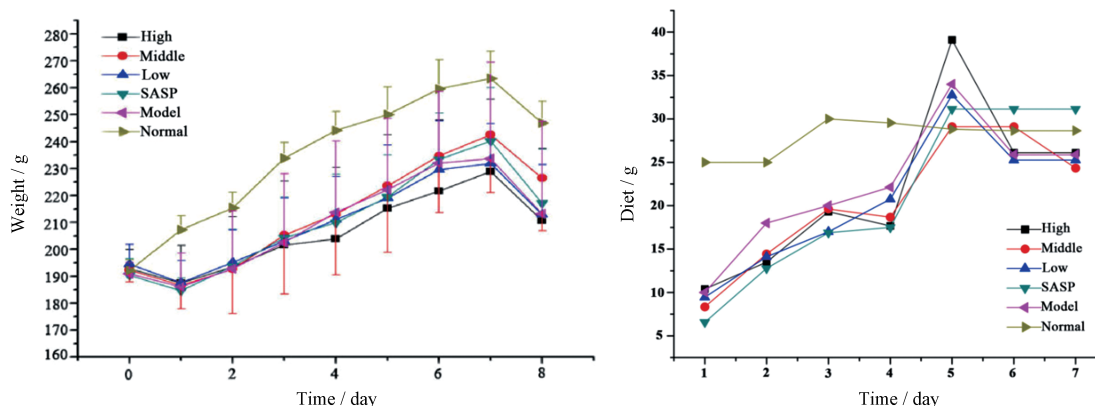


Figure 1 Body weight and food quantity change after 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic (TNBS)-induced ulcerative colitis. $n = 7, \bar{x} \pm s$. Normal: Normal group; Model: Model group; SASP: Salazosulfapyridine group ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); High: High dose of Huangqin Tang (HQT) group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); Middle: Middle doses of HQT group ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); Low: Low dose of HQT group ($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

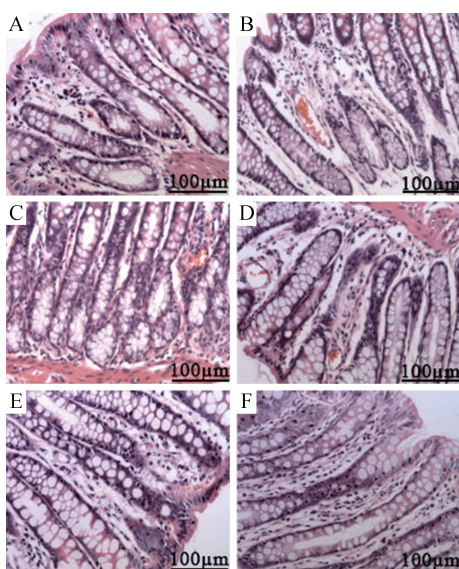


Figure 2 Microscopic damage of colon tissue of rats. A: Normal group; B: Model group; C: SASP groups; D: High dose of HQT group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); E: Middle dose of HQT group ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); F: Low dose of HQT group ($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

病变与模型组相比, 病变都有明显减轻。

3 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 CAT、MPO、GSH-px、SOD 的影响

大鼠造成溃疡性结肠炎模型后, 连续给药 5 天后

血清中 SOD、CAT、GSH-px、MPO 含量, 结果如表 1 所示。模型组血清 SOD、CAT、GSH-px 活性较正常组均有显著性下降, 而模型组血清 MPO 活性较正常组显著增加。SASP 组和黄芩汤高、中、低剂量组血清中 SOD 活性与模型组相比有上升趋势但无显著性差异; 黄芩汤高、中剂量组中 CAT 活性与模型组相比有显著性差异; 黄芩汤高、中、低剂量组中 GSH-px 活性与模型组相比均有显著性差异; 黄芩汤高、中、低剂量组血清中 MPO 活性与模型组相比有降低趋势, 但均无显著性差异。

4 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 LPO 的影响

如图 3 所示, 与正常组相比, 模型组血清中 LPO 的

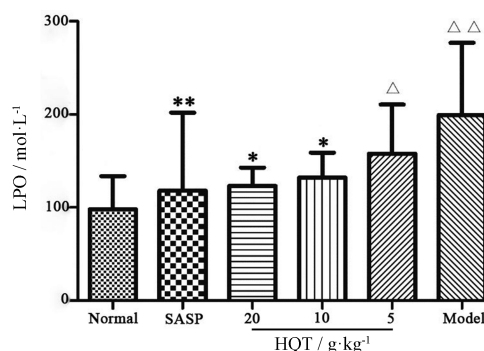


Figure 3 The effects of HQT on the lipid peroxide (LPO) levels of serum induced by TNBS in rats. $n = 7, \bar{x} \pm s$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs model group; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs normal group

Table 1 The effects of HQT on the SOD, CAT, GSH-px, MPO of serum induced by TNBS in rats. $n = 7, \bar{x} \pm s$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs model group; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs normal group. CAT: Catalase; GSH-px: Glutathione peroxidase; MPO: Myeloperoxidase; SOD: Superoxide dismutase

Group	T-SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH-px/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MPO/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
Normal	558.41 ± 22.54	6.30 ± 1.27	1933.59 ± 120.76	3.91 ± 0.37
Model	$483.11 \pm 57.64^{\triangle}$	$4.88 \pm 1.50^{\triangle}$	$998.16 \pm 345.36^{\triangle\triangle}$	$5.55 \pm 0.84^{\triangle\triangle}$
SASP	547.62 ± 75.49	$10.70 \pm 3.88^{**\triangle}$	$1499.03 \pm 444.63^{**\triangle}$	$4.89 \pm 0.72^{\triangle}$
HQT $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	510.91 ± 51.54	$8.17 \pm 3.21^*$	$1481.61 \pm 261.88^{**}$	$4.81 \pm 0.63^{\triangle}$
HQT $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	538.98 ± 107.11	$8.68 \pm 2.40^{**}$	$1305.22 \pm 321.01^{**\triangle\triangle}$	$4.98 \pm 0.85^{\triangle\triangle}$
HQT $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	517.66 ± 28.92	5.72 ± 2.20	$1614.06 \pm 249.08^{**}$	$5.17 \pm 0.64^{\triangle\triangle}$

含量显著升高 ($P < 0.01$); 而与模型组相比, 黄芩汤高、中、低剂量组均能降低 LPO 的含量, 其中, 高剂量组和中剂量组具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

5 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 Nrf2 表达的影响

免疫组化检测结果如图 4 所示, 正常组大鼠结肠组织仅见少量黄色颗粒, SASP 组和黄芩汤高、中剂量组与模型组相比, Nrf2 阳性细胞表达数增加, 具显著性差异, 黄芩汤低剂量组未见显著性差异。

6 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 HO-1、NQO-1 表达的影响

Western blot 结果 (图 5) 显示, 与模型组相比, 黄芩

汤各给药组与 SASP 组均能够增加组织内 HO-1 和 NQO1 的表达, 并且呈现一定的剂量依赖关系, 但无显著性差异。

讨论

黄芩汤出自《伤寒论》, 由黄芩、芍药、甘草和大枣配伍而成, 为清热止痢、和中止痛常用方, 目前临床上广泛用于治疗溃疡性结肠炎、急性胃肠炎、细菌性痢疾等疾病^[8,9]。本课题组前期研究发现了一些黄芩汤治疗 UC 的作用机制, 包括通过抑制 TLR4 蛋白表达, 影响 MyD88 引发信号通路下游的基因表达从而抑制 NF- κ B 的活化, 减少 COX-2 及 iNOS 位点结合, 减少

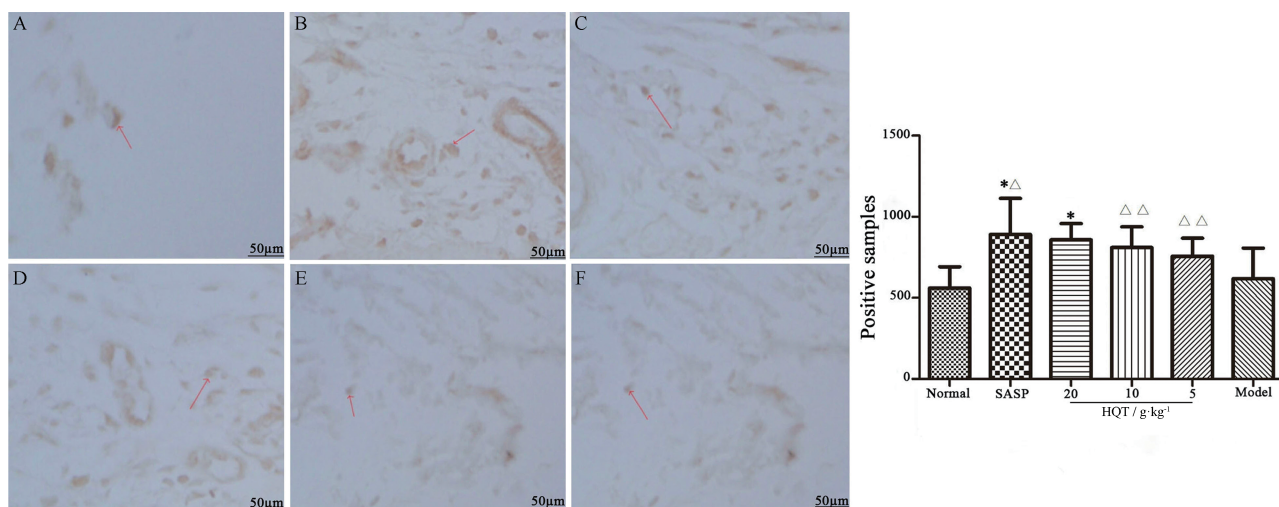


Figure 4 The effects of HQT on the nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) levels of colons induced by TNBS in rats. A: Normal group; B: SASP group; C: High dose of HQT group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); D: Middle dose of HQT group ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); E: Low dose of HQT group ($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); F: Model group. $n = 7, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group

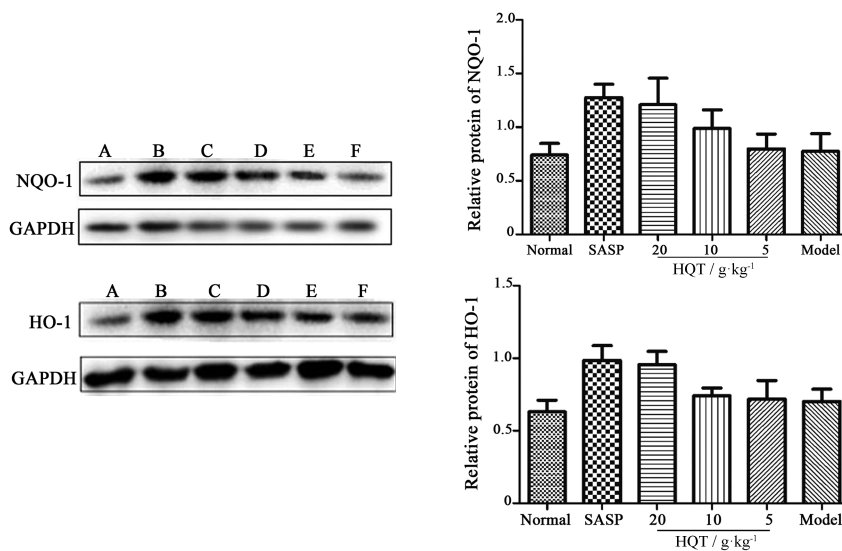


Figure 5 The effects of HQT on the NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) and heme oxygenase (HO-1) expression of colon induced by TNBS in rats. A: Normal group; B: SASP group; C: High dose of HQT group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); D: Middle dose of HQT group ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); E: Low dose of HQT group ($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); F: Model group. $n = 7, \bar{x} \pm s$

NO、PGE₂及IL-17等促炎因子的释放以及机体免疫系统过度活化^[10];抑制NF- κ B p65活化进而下调复杂的促炎细胞因子网络,减轻肠道炎性反应和黏膜损伤等。本实验从黄芩汤调控Nrf2通路入手,通过对相应指标的检测,从抗氧化应激的角度来对黄芩汤治疗UC的作用机制进行阐述。

正常生理状态下,体内氧化与抗氧化处于相对平衡状态,当机体受到外界刺激或亲电子物质侵袭时,体内活性氧自由基(ROS)或氮自由基(RNS)分泌过多,在机体生理环境正常时,细胞用复杂的抗氧化防御机制来调控ROS的水平。而在病理状况下,如慢性炎症时,过量的活性氧自由基会导致细胞功能紊乱和重构^[11],从而引起氧化应激失衡,导致溃疡性结肠炎的发生。

Nrf2属于cap'n'collar(CNC)转录因子家族,是细胞抗氧化应激体系中的关键转录因子及维持细胞内氧化还原稳态的中枢调节物质,其信号通路是目前发现的最为重要的一条内源性抗氧化通路。正常生理状态下,Nrf2多存在于细胞浆中,与胞质蛋白Keap-1结合,当受到亲电子试剂或氧化刺激时,Nrf2迅速从复合物中解离出来,活化转位进入细胞核,进而调控下游多种抗氧化酶和II相解毒酶如HO-1、NQO-1、CAT等的表达^[12,13]。HO-1是一种可诱导的蛋白质,当体内处于缺血、缺氧以及应激环境时,其表达可成倍增加,研究发现,HO-1及其代谢产物具有明显的抗氧化作用^[14]。而NQO-1可通过催化醌类物质发生双电子还原反应,阻止后者参与氧化还原反应和ROS的产生^[15]。

SOD可以清除机体内产生的超氧化阴离子,有抗氧化等重要作用,当其含量和活力降低时,将导致自由基的堆积;另一方面,自由基损害细胞膜脂质双层中的不饱和脂肪酸会产生脂质过氧化物(LPO),它进一步与磷脂酰乙醇胺和蛋白质交联成大分子复合物导致疾病的发生,因此通过测定SOD和LPO含量可反映机体脂质过氧化反应程度^[16]。CAT是机体抗氧化系统中酶系统的重要组成部分,可与SOD协同清除自由基,常存在于细胞的过氧化物中,主要功能是清除H₂O₂,使其转变为H₂O和氧气,保护机体免受损害,因而其含量可用来衡量机体的抗氧化能力^[17]。而GSH-px是机体内广泛存在的过氧化氢酶,可以保护细胞膜结构和功能免受过氧化氢的氧化损伤^[18]。MPO是中性粒细胞嗜天青颗粒产生的一种重要的过氧化物酶,主要存在于嗜中性粒细胞和单核细胞中,其活性高低反映了中性粒细胞浸润程度^[19]。

本研究结果显示,黄芩汤可明显改善溃疡性结肠炎大鼠的体征,还能够降低血清中LPO、MPO的含量,升

高SOD、GSH-px、CAT含量,并通过调节Nrf2调控下游抗氧化基因和II相解毒酶的表达对溃疡性结肠炎产生一定的治疗作用,为进一步的深入研究奠定了基础,也为更好的临床研究提供了参考。

References

- [1] Tew GW, Hanckney JA, Gibbons D, et al. Association between response to etrolizumab and expression of integrin E and granzyme a in colon biopsies of patients with ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150: 477-487.
- [2] Hindryckx P, Baert F, Hart A, et al. Clinical trials in ulcerative colitis: a historical perspective [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9: 580.
- [3] Ng WK, Wong SH, Ng SC. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia [J]. *Int Res*, 2016, 14: 111-119.
- [4] Jin Y, Yang J, Lin L, et al. The attenuation of scutellariae radix extract on oxidative stress for colon injury in lipopolysaccharide induced RAW264.7 cell and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis rats [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12: 153-159.
- [5] Wang YW, Zhang HH, Wang YL, et al. Effect of Huangqin Tang on the regulatory NF- κ B p65 signal pathway in rats with ulcerative colitis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 21-27.
- [6] Nariaki F, Jun K. Increase in prostate stem cell antigen expression in prostatic hyperplasia induced by testosterone and 17 β -estradiol in C57BL mice [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 158: 56-62.
- [7] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96: 795-803.
- [8] Zou Y, Lin J, Li W, et al. Huangqin-tang ameliorates dextran sodium sulphate-induced colitis by regulating intestinal epithelial cell homeostasis, inflammation and immune response [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39299.
- [9] Xi JS. The Clinical Study of Huangqin Tang on Ulcerative Colitis (黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的临床研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2006.
- [10] Wang DF, Wang YL, Wang YW, et al. Effect of Huangqin Tang on the function of regulatory TLR4/MyD88 signal pathway in rats with ulcerative colitis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1558-1563.
- [11] Rani V, Deep U, Singh RK, et al. Oxidative stress and metabolic disorder; pathogenesis and therapeutic strategies [J]. *Life Sci*, 2016, 148: 183-193.
- [12] Eve DJ, Steele MR, Sanberg PR, et al. Hyperbaric oxygen therapy as a potential treatment for post-traumatic stress disorder with traumatic brain injury [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016,

- 12: 2689-2705.
- [13] Zhang X, Wang X, Sun X, et al. Differences in cognitive function of rats with traumatic brain injuries following hyperbaric oxygen therapy [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2608-2615.
- [14] Ayman M, Mousa O, Khalid M, et al. Commiphora molmol protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by upregulating Nrf2 / ARE / HO-1 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 499-509.
- [15] Yu J, Wu XX, Wang CX, et al. NQO1 dependent non-canonical necroptosis mediated by ROS and RIP1/RIP3 in parallel in glioma cancer cells [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2018, 32: 326-327.
- [16] Yang X, Guo T, Wang Y, et al. Therapeutic effect of ginsenoside Rd in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35: 1231-1239.
- [17] Krajka-kuźniak V, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69: 393-402.
- [18] Wang GW, Zhang XL, Wu QH, et al. The hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* extract and its isolated major constituent through Nrf2 activation and NF- κ B inhibition [J]. *Phytomedicine*, 2018, 53: 263-273.
- [19] Sarlos P, Kovesdi E, Magyari L, et al. Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: review of the current literature [J]. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2014, 5: 304-321.