

清肠化湿方通过激活 AhR/IL-22 缓解小鼠溃疡性结肠炎的作用机制研究

屈芸, 朱磊, 王琼, 王耀辉, 胡静怡, 连紫宇, 吉跃进, 周恩, 沈洪

(南京中医药大学附属医院/江苏省中医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 通过构建溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)小鼠模型,从芳香烃受体(AhR)角度,观察清肠化湿方对白细胞介素-22(IL-22)分泌及黏蛋白-2(MUC-2)与紧密连接蛋白(Claudin4)表达的作用,阐述其缓解小鼠 UC 的作用机制。方法 用 DSS 构建 UC 小鼠模型,每日观察小鼠体质量、粪便形状、隐血情况,同时进行疾病活动指数(DAI)评分。给药结束后测量小鼠结肠长度,HE 染色观察结肠病理情况,qPCR 检测结肠组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、AhR 的 mRNA。Western blot 检测结肠 MUC-2、AhR、细胞色素 P4501A1 酶(CYP1A1)、IL-22、Claudin4 表达水平。结果 与正常组比较,模型组小鼠 DAI 评分上升($P < 0.01$),结肠长度缩短($P < 0.01$),结肠黏膜病理受损情况严重;AhR 的 mRNA 表达下降($P < 0.05$),IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);MUC-2、AhR、CYP1A1、IL-22、Claudin4 蛋白表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组、清肠化湿方组 DAI 评分降低($P < 0.01$),结肠长度变长($P < 0.01$),结肠黏膜病理情况改善;IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);MUC-2、CYP1A1、Claudin4 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,清肠化湿方组 AhR 的 mRNA 表达上升($P < 0.05$),AhR、IL-22 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与清肠化湿方组比较,清肠化湿方+TMF 组小鼠 DAI 评分上升($P < 0.01$);结肠长度缩短($P < 0.05$);结肠黏膜病理受损情况严重;IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达上升($P < 0.01$);MUC-2、AhR、CYP1A1、IL-22、Claudin4 蛋白表达下降($P < 0.01$)。结论 清肠化湿方能够激活 AhR,上调 CYP1A1 表达,促进 IL-22 生成,抑制炎症水平,同时增加 MUC-2 及 Claudin4 的表达,从而缓解 UC。

关键词:溃疡性结肠炎;清肠化湿方;芳香烃受体;白细胞介素-22

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2021)06-0823-07

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2021.0823

引文格式:屈芸,朱磊,王琼,等.清肠化湿方通过激活 AhR/IL-22 缓解小鼠溃疡性结肠炎的作用机制研究[J].南京中医药大学学报,2021,37(6):823-829.

Research on the Effect and Mechanism of Qingchang Huashi Recipe on Relieving Colitis in Mice through AhR/IL-22

QU Yun, ZHU Lei, WANG Qiong, WANG Yao-hui, HU Jing-yi, LIAN Zi-yu, JI Yue-jin, ZHOU En, SHEN Hong

(The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To explore the therapeutic effect of Qingchang Huashi recipe on colitis model mice, and explore from the perspective of aromatic hydrocarbon receptor(AhR), to explore the effect of Qingchang Huashi recipe on IL-22 secretion and mucin and tight junction protein expression, and to explain alleviate the mucosal damage mechanism of colitis model mice, so as to provide objective basis for clinical application and drug research and development. **METHODS** The mouse model of colitis was established by DSS, the body mass, fecal shape, occult blood and DAI score of disease activity index were observed every day. The colon length of mice was measured after administration, and the colonic pathology was observed by HE staining. qPCR was used to detect the mRNA of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and AhR in colon tissue. The expression levels of colonic mucin(MUC-2), AhR, cytochrome 4501A1(CYP1A1), interleukin-22(IL-22) and tight junction protein (Claudin4) were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the normal group, the DAI score of the model group increased($P < 0.01$),

收稿日期:2021-07-21

基金项目:国家自然科学基金(81673905,81873260);国家重点研发计划(2017YFC1700104);江苏省科技厅项目(BE2019769);江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发[2018]87号);江苏省研究生培养创新工程科研与实践创新计划(KYCX20_1530,SJXC20_0508)

第一作者:屈芸,女,硕士研究生,E-mail:20181042@njucm.edu.cn

通信作者:沈洪,男,教授,博士生导师,主要从事中医药治疗脾胃系疾病研究,E-mail:shenhong999@163.com

the length of colon shortened ($P < 0.01$), the pathological damage of colonic mucosa was severe, the mRNA expression of AhR decreased ($P < 0.05$), the mRNA expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expressions of MUC-2, AhR, CYP1A1, IL-22 and Claudin4 decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the DAI score of mesalazine group and Qingchang Huashi Recipe group decreased ($P < 0.01$), the length of colon lengthened ($P < 0.01$), the pathological condition of colonic mucosa improved, the mRNA expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expressions of MUC-2, CYP1A1, Claudin4 protein increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expression of AhR increased ($P < 0.05$). The expression of AhR and IL-22 protein in Qingchang Huashi Recipe group increased ($P < 0.01$). Compared with the Qingchang Huashi Recipe group, the DAI score of the Qingchang Huashi Recipe + TMF group increased ($P < 0.01$), the length of colon was shortened ($P < 0.05$), the pathological damage of colonic mucosa was serious, the mRNA expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6 increased ($P < 0.01$), the expressions of MUC-2, AHR, CYP1A1, IL-22 and Claudin4 decreased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Qingchang Huashi Recipe can activate AhR, to up-regulate CYP1A1 protein, promote the production of IL-22, inhibit the level of inflammation, increase the expression of mucin and tight junction protein, and relieve colitis.

KEYWORDS: ulcerative colitis; Qingchang Huashi Recipe; AhR; IL-22

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性胃肠道炎症性疾病,病程常超过 6 周,患者以腹泻、腹痛、黏液脓血便等为主^[1]。近年来,其发病率逐年上升^[2]。中医学无“溃疡性结肠炎”之说,参照其症状,将其归为古籍“久痢”“肠澼”“泄泻”之类^[3]。治疗时,西医多用传统药物(5-氨基水杨酸类药物、糖皮质激素、免疫抑制剂)、生物制剂、营养支持治疗与外科手术治疗等^[4],中医常用多种方式联合治疗,包括口服中药、灌肠、针灸等。UC 病机总属本虚标实,沈洪教授认为 UC 活动期患者病机当属湿热之邪壅滞肠膜,损伤肠络,导致气血失调,其结合多年临证经验及现代研究,针对湿热病机,运用清肠化湿方治疗 UC 疗效可靠^[5]。本方由白头翁、白芍、黄芩、地榆、白芷等药物组成,共奏清热除湿、凉血止痢之效。

芳香烃受体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)属于螺旋-环-螺旋超家族,多以未活化的方式广泛表达于多种细胞的胞浆中,一旦被特异性的配体激活,AhR 便进入细胞核并与 AhR 核转位子结合形成二聚体,启动一系列下游目的基因的表达。AhR 可以促进 Th17 细胞和 3 型先天淋巴细胞(ILC3)产生白介素(IL)-22,并对其有重要的调节作用^[6]。此外,肠道微生物还可以通过影响 AhR 配体来调节 IL-22 的产生。IL-22 可以由不同的细胞产生,比如活化的 T 细胞、NK 细胞等,而在肠道中,ILC3 是 IL-22 的主要来源^[7]。ILC3 主要通过分泌细胞因子调节炎症,其功能的维持与 AhR 的活性密切相关^[8]。IL-10 和 IL-22 有共同的 β 链 IL-10R β , 负责信号传递^[9]。肠道微生物产生的部分代谢产物能够结合并激活 AhR,被激活的 AhR 可诱导下游细胞

因子 IL-22 的表达,从而调节肠道内环境的稳态。

前期研究表明清肠化湿方能够减轻 UC 小鼠炎症免疫反应,影响 Th17 分化,促进 IL-10 分泌,诱导肠干细胞再生^[10]。但本方是否通过影响 AhR 及肠道黏膜屏障,进而影响 IL-22 分泌及黏蛋白(MUC-2)与紧密连接蛋白(Claudin4)的表达尚未明确,因此本研究旨在探讨本方的相关作用机制,并为未来的科学研究提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 动物

48 只雄性 SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠,体质量 20~22 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。动物许可证号:SCXK(浙)2019-0001。在南京中医药大学实验动物中心动物房饲养。小鼠适应环境 1 周(每日自由进食饮水),温度 24~25 °C,湿度 50%~60%,每日 12 h 光照,12 h 避光。

1.2 药物与试剂

清肠化湿方(白头翁 15 g,白芍 15 g,黄芩 10 g,白芷 10 g,地榆 15 g,黄芪 15 g)中药购自江苏省中医院药房。经南京市药品检验所质量检验,鉴定为合格中药饮片。称取清肠化湿方生药,用 1 200 mL 蒸馏水浸泡 60 min,煎煮 60 min,滤过收集煎煮液;剩余药渣用 1 200 mL 蒸馏水,二次煎煮 60 min,滤过收集煎煮液。合并 2 次药液,4 °C 4 000 \times g 离心 10 min,取上清,浓缩成 12 g \cdot kg⁻¹水煎剂。DSS(分子量:36 000~50 000 kDa,美国 MP Biomedicals 公司,货号:0216011050);美沙拉嗪肠溶片(佳木斯鹿灵制药有限公司,货号:190311),经研磨配成 0.3 g \cdot mL⁻¹混悬液;AhR 拮抗剂 6,2',4'-Trimethoxyflavone(TMf, Sigma 公司,货号:T4080),浓

度配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 抗体 MUC-2(ab272692)、AhR(sc-133088)、细胞色素 P450 1A1(CYP1A1)(sc-25304)、IL-22(ABP57408)、Claudin4(ab15104)、 β -actin(sc-47778); TrizolTM Reagent RNA 提取剂(Ambion 公司, 货号: 15596026); HiScript II QRT SuperMix for qPCR, ChamQ UNiversal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme 公司, 货号: R223-01, Q711-02/03); PCR 引物(Invitrogen 公司, 货号: HG1910090009); MDF-38 超低温冰箱(日本三洋公司); 7500 fast 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); PowerPac Basic 电泳仪, Mini PROTEAN Tetra Cell 电泳槽(美国 Bio-Rad 公司); Mini PROTEAN Tetra Cell 转膜槽(美国 Bio-Rad 公司); CHEMI-DOC XRS+ 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); CKX41 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 5804R 超速离心机(德国 Eppendorf 公司); ELX-800 酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.3 分组及模型制备

48 只小鼠随机分为正常组(Ctrl)、模型组(DSS)、美沙拉嗪组(5-ASA)、清肠化湿方组(QCHS)、清肠化湿方+TMF 组(QCHS+TMF)、TMF 组(TMf)。每组 8 只。除正常组外, 小鼠均饮用含 2.5% DSS 蒸馏水 1 周造成 UC 模型。美沙拉嗪组给予 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 美沙拉嗪溶液灌胃, 清肠化湿方组按照 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 中药灌胃。清肠化湿方+TMF 组按照 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 中药灌胃 + $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TMF 腹腔注射, TMF 组按照 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TMF 腹腔注射, 其余组给予 0.9% 生理盐水腹腔注射。灌胃及腹腔注射共 10 d, 于第 11 天处死小鼠。

1.4 取材

取材时, 收集小鼠血清、结肠、结肠内容物。具体取材方法如下: 用镊子摘取小鼠眼球, 取血至离心机按照 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 收集上层血清, 保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。采用颈椎脱臼法处死小鼠, 75% 乙醇浸润小鼠, 沿腹中线剪开腹部皮肤、腹肌、腹膜, 暴露腹腔。分离回肠、结肠, 置于冰板上, 去除结肠表面脂肪组织, 测量长度并拍照, 取回肠于 1.5 mL EP 管, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存; 纵剖结肠, 取出结肠内容物置于 1.5 mL EP 管中, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将纵剖后的结肠用预冷的 PBS 冲洗干净, 在滤纸上吸干。取末端 1 cm 处的组织放入 4% 多聚甲醛中固定, 剩余组织 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 一般情况、疾病活动指数(Disease activity index, DAI)及结肠长度变化 每天观察小鼠毛色、尿液颜色、精神状态等一般情况, 记录小鼠体质量、粪便质地及便血情况, 对小鼠进行 DAI 评分^[11], 具体评分见表 1。

表 1 DAI 评分标准

体质量下降率/%	大便性状	便血情况	评分
0	正常	阴性	0
1~5	正常	隐血(+)	1
6~10	松散	隐血(++)	2
11~15	松散	隐血(+++)	3
>15	稀便	肉眼血便	4

注: DAI=(体质量下降率评分+大便性状评分+便血情况评分)/3。正常大便: 成形便; 松散大便: 糊状、半成形便, 不黏附于肛门; 稀便: 稀水样便, 可黏附于肛门。

1.5.2 结肠病理切片观察 将 4% 多聚甲醛中固定的组织进行常规石蜡包埋, 切片厚度为 $4\sim 5 \mu\text{m}$, 进行常规 HE 染色, 在光镜下观察并拍照。

1.5.3 Western blot 检测小鼠结肠组织 MUC-2、AhR、CYP1A1、IL-22、Claudin4 蛋白水平 取出一 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的结肠组织 100 mg, 使用 RIPA 缓冲液与蛋白酶抑制剂混合, 离心匀浆, 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白质浓度并计算出上样量。取蛋白样品在 80 V, 30 min, 120 V, 60 min 条件下进行 SDS-PAGE 分析。转膜时, 恒流 300 mA, 90 min。转膜后, 用 5% 脱脂牛奶进行封闭 60 min。洗膜后将膜与抗体放在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下过夜, 次日用 TBST 10 min 洗膜 3 次, 常温二抗孵育 60 min, 再用 TBST 10 min 洗膜 3 次。用增强化学发光(ECL)检测。用 Image Lab 软件分析化学发光信号。收集数据并从 3 个独立样本中分析。

1.5.4 qPCR 检测结肠组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、AhR 的 mRNA 水平 取小鼠结肠组织于 1 mL Trizol 中充分裂解后, 进行氯仿萃取及异丙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 溶于 $20 \mu\text{L}$ DEPC 水中。测量 RNA 浓度及纯度合格后, 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录, 得到 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行扩增目的基因。反应体系为 $10 \mu\text{L}$; SYBR qPCR Premix Ex Taq $5 \mu\text{L}$, 上下引物各 $0.2 \mu\text{L}$, DEPC 水 $3.6 \mu\text{L}$, DNA $1 \mu\text{L}$ 。设置反应条件: 预变性($95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s)循环 1 次; 扩增($95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 s; $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s), 循环 40 次; 溶解曲线($95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 s; $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 s; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 s); 循环 1 次。引物由 Invitrogen 公司合成, 核

苷酸序列见表 2。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对 qPCR 结果进行分析。

表 2 qPCR 引物序列

基因	引物	序列
GAPDH	F	5-CCATTTGCAGTGGCAAAG-3'
	R	5-CACCCCATTTGATGTTAGTG-3'
IL-1 β	F	5-CTGTGTCTTTCCCGTGGACC-3'
	R	5-CAGCTCATATGGGTCCGACA-3'
TNF- α	F	5-TCAGCCGATTTGCTATCTCA-3'
	R	5-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
IL-6	F	5-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3'
	R	5-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3'
AhR	F	5-CAAAGGGCAGCTTATTCTGG-3'
	R	5-GGTCTCTGAGTGGCGATGAT-3'

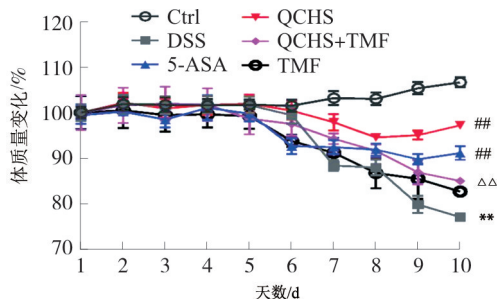
1.6 统计学方法

运用 SPSS23.0 软件对数据进行处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据满足正态分布和方差齐性,各组间采用单因素方差分析。各组间的两两比较采用 LSD 检验方法,方差不齐则采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况

正常组小鼠毛色正常,行动灵敏,饮食、粪便正常。模型组小鼠给 2.5% DSS 后出现进食量显著降低,明显肉眼血便,肛门口有血便附着,体质量下降;美沙拉嗪组、清肠化湿方组灌胃后,毛色、活动状态、血便呈好转状态。清肠化湿方+TMF 组、TMF 组小鼠毛发光泽下降,进食量降低,见到肉眼血便,体质量下降。各组小鼠体质量变化见图 1,结肠形态见图 2。



注:与 Ctrl 组相比, ** $P < 0.01$; 与 DSS 组相比, $^{##} P < 0.01$; 与 QCHS 组相比, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 1 各组小鼠的体质量变化

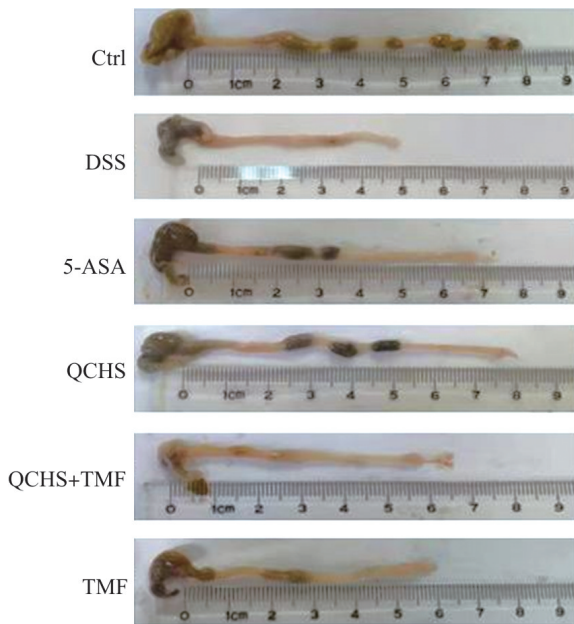


图 2 各组小鼠的结肠外观

2.2 各组小鼠结肠长度及 DAI 评分

与正常组比较,模型组小鼠结肠长度缩短 ($P < 0.01$),DAI 评分升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组、清肠化湿方组小鼠结肠长度增加 ($P < 0.01$),DAI 评分降低 ($P < 0.01$)。与清肠化湿方组比较,清肠化湿方+TMF 组小鼠结肠长度缩短 ($P < 0.05$),DAI 评分升高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 各组小鼠 DAI 评分和结肠长度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	结肠长度/cm	DAI 评分
Ctrl	7.65 \pm 0.50	0
DSS	4.37 \pm 0.60**	3.06 \pm 0.88**
5-ASA	7.00 \pm 0.80 $^{##}$	0.94 \pm 0.14 $^{##}$
QCHS	6.98 \pm 0.16 $^{##}$	1.11 \pm 0.17 $^{##}$
QCHS+TMF	3.95 \pm 0.44 $^{\Delta\Delta}$	2.94 \pm 0.65 $^{\Delta\Delta}$
TMF	3.93 \pm 0.36 $^{\Delta\Delta}$	3.44 \pm 0.54 $^{\Delta\Delta}$

注:与 Ctrl 组相比, ** $P < 0.01$; 与 DSS 组相比, $^{##} P < 0.01$; 与 QCHS 组相比, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ 。

2.3 各组小鼠结肠组织病理情况

正常组小鼠结肠组织结构完整清晰,杯状细胞及隐窝结构未有破坏;模型组可见溃疡形成,未见隐窝,黏膜糜烂。美沙拉嗪组及清肠化湿方组较模型组溃疡、黏膜损伤情况均明显减轻;清肠化湿方+TMF 组及 TMF 组可见溃疡,腺体数量下降,大量炎细胞浸润。见图 3。

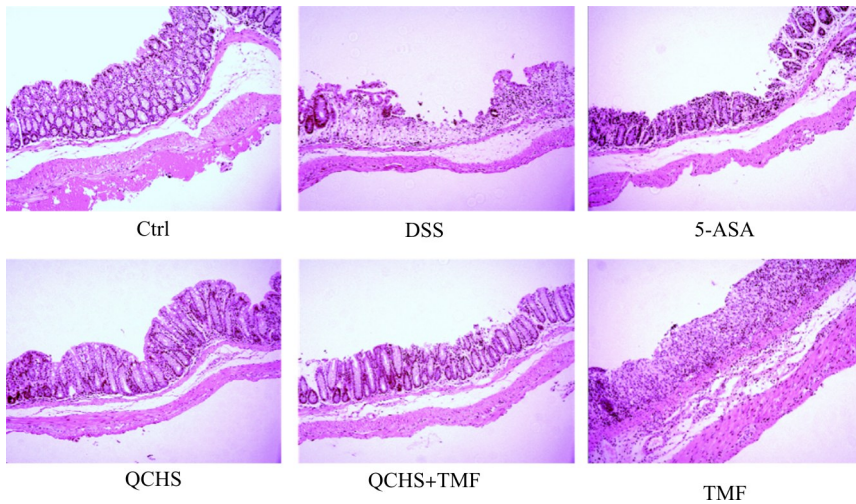
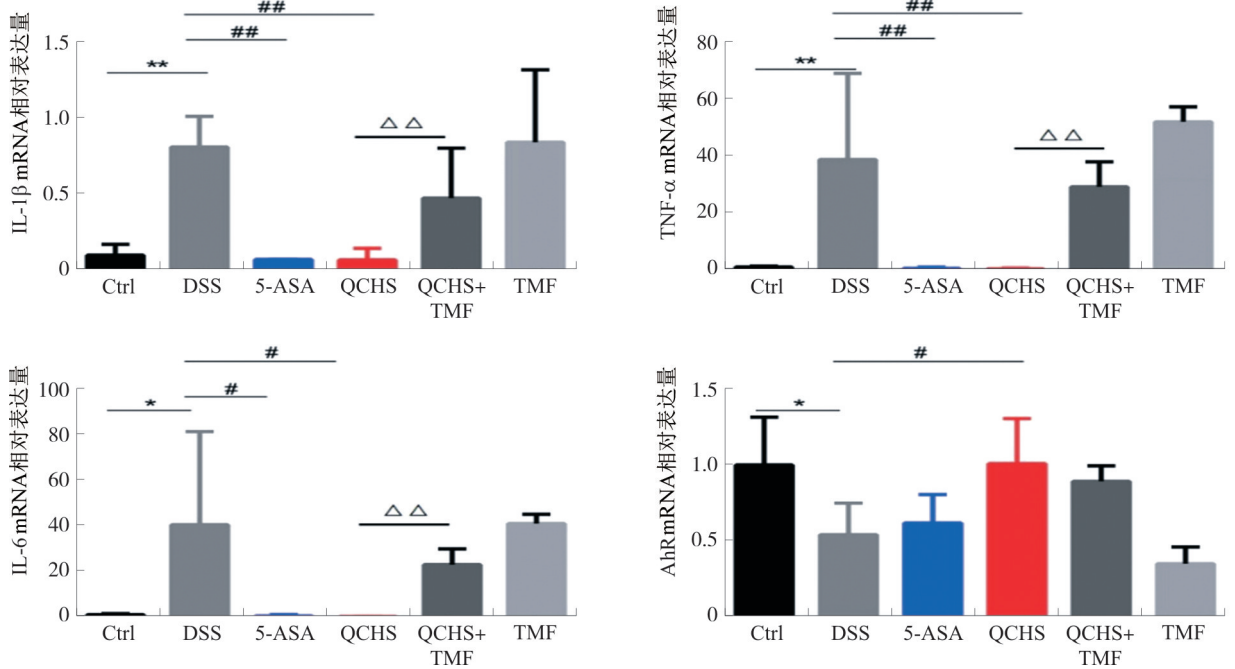


图3 各组小鼠结肠组织病理状况(HE,×100)

2.4 各组小鼠结肠组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、AhR 的 mRNA 水平

与正常组比较,模型组小鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达上升($P < 0.05$, $P < 0.01$), AhR 的 mRNA 表达下降($P < 0.05$)。与模型组比较,美沙

拉嗒组、清肠化湿方组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),清肠化湿方组 AhR 的 mRNA 表达上升($P < 0.05$)。与清肠化湿方组比较,清肠化湿方+TMF 组小鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达上升($P < 0.01$)。见图4。



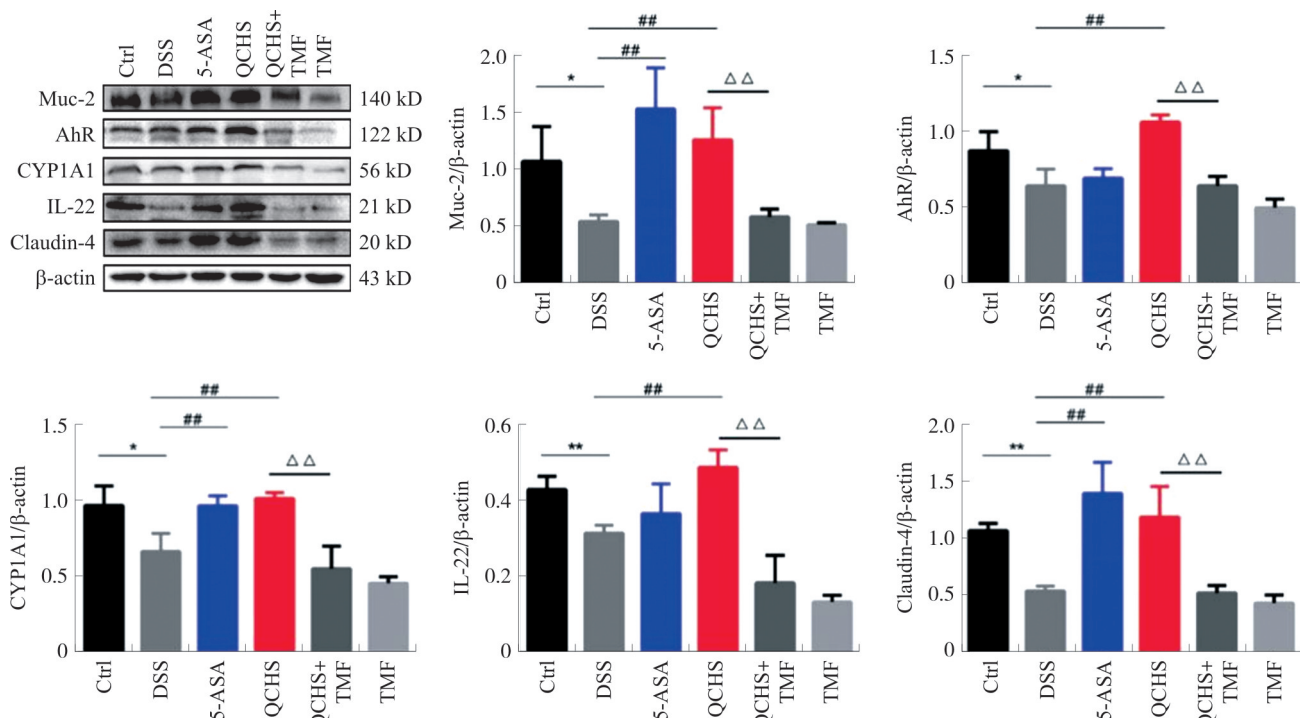
注:与 Ctrl 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DSS 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 QCHS 组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图4 各组小鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、AhR 的 mRNA 表达比较

2.5 各组小鼠结肠组织 MUC-2、AhR、CYP1A1、IL-22、Claudin4 蛋白表达

与正常组比较,模型组结肠组织中 MUC-2、AhR、CYP1A1、IL-22、Claudin4 蛋白表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,美沙拉嗒组、清肠化湿方组 MUC-2、CYP1A1、Claudin4 蛋白表达升

高($P < 0.01$);与模型组比较,清肠化湿方组 AhR、IL-22 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与清肠化湿方组比较,清肠化湿方+TMF 组小鼠 MUC-2、AhR、CYP1A1、IL-22、Claudin4 蛋白表达下降($P < 0.01$)。见图5。



注:与 Ctrl 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 DSS 组相比,## $P < 0.01$;与 QCHS 组相比,△△ $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 5 各组小鼠结肠组织中 MUC-2、AhR、CYP1A1、IL-22、Claudin4 蛋白水平

3 讨论

UC 作为临床疑难病之一,发病率在我国迅速上升。从中医角度分析,其病机责之湿热二邪,湿热蕴结脉络,日久入于血分,以致肠道受损,传导失责,最终出现腹痛、腹泻、黏液血便等症状。本方中白头翁、黄芩可清肠化湿解毒,祛除湿热之邪,以除病因之本;白芍柔肝健脾,同调肝脾;地榆清热为主,亦可止血,以防出血之弊,白芷止痛为先,亦可燥湿;加以生黄芪扶正御邪、调节免疫,盖因黄芪尤擅补益脾肺之气,培补土气则气血生化有源,充盈肺气则固表御邪有力。

免疫因素是 UC 的关键发病机制之一^[12]。AhR 是一种转录因子^[13],在免疫细胞中高度表达,可以介导一系列反应^[14]。AhR 可以促进 Th17 细胞和 ILC3 产生 IL-22^[15]。IL-22 作为 IL-10 家族成员之一,在炎症性肠病(IBD)患者中,其分泌和功能调控可以推动细胞再生、防御、组织重构。IL-22 的多种下游机制参与介导先天免疫、获得性免疫和组织稳态的调节。

CYP1A1 是一种参与多种药物代谢的 I 相酶,是 AhR 的下游靶基因^[16]。它受经典的 AhR 信号通路控制^[17]。激活的 AhR 通过维持肠道干细胞稳态和屏障完整性来调节肠道内环境平衡^[18]。研究表明 IBD 患者的肠道组织中,AhR 的表达受到明显

抑制,UC 模型小鼠在使用 AhR 激动剂后,其炎症得到显著缓解^[19-20]。AhR 在肠道中广泛表达,其激活与 UC 的转归有关^[21]。UC 患者体内 AhR 的表达下调。研究表明,在 UC 模型小鼠中,AhR 的活化受到抑制,表达下降,说明 AhR 在肠道炎症中起到重要的作用^[22]。活化的 AhR 可以促进 IL-22 的产生,并对其有重要的调节作用,从而抑制炎症^[23]。

肠黏膜屏障由抗菌因子和黏液支撑,可以阻止微生物破坏免疫系统^[24-25]。UC 患者的上皮功能和黏膜屏障受到破坏^[26],杯状细胞分泌的黏液组分减少,肠道渗透性增加,导致肠道微生物群的破坏^[27]。黏蛋白是一种高度糖基化的 O-糖蛋白,由分泌上皮细胞产生,在肠道内起到抵御病原体、有害物质的屏障作用。其中 MUC-2 是结肠中黏蛋白的主要成分,在 UC 患者中,MUC-2 的分泌减少,因此恢复 MUC-2 水平可以改善 UC^[28]。有报道表明,UC 会导致紧密连接蛋白水平显著下调,肠道对微生物配体和有害代谢物的通透性显著增加,从而导致全身炎症反应,因此恢复肠道屏障的完整性对 UC 患者极为重要^[29]。

课题组前期研究结果显示清肠化湿方组小鼠的色氨酸代谢增加,色氨酸可以代谢产生内源性 AhR 配体,从而维持肠道内环境的稳定和正常的新陈代谢。肠道内的大肠杆菌、变形杆菌、芽孢杆菌等都能

将色氨酸代谢成吡啶及吡啶酸衍生物,它们是 AhR 的微生物配体,具有抗炎活性,促进 AhR 活化及 IL-22 释放,从而维持肠道内环境的稳定。

目前 IL-22 已成为 UC 药物研发的关键靶点之一,本研究紧密结合疾病发病机制,围绕免疫与肠黏膜屏障进行研究。实验结果表明清肠化湿方可以改善 UC 模型小鼠的肠道损伤,促进 UC 的恢复。其机制可能通过激活 AhR,上调 CYP1A1 蛋白,促进 IL-22 生成,抑制炎症水平,同时增加 MUC-2 及 Claudin4 的表达,修复肠黏膜屏障,从而缓解 UC,并为临床实践提供实验依据。

参考文献:

- [1] 吴开春,梁洁,冉志华,等. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018年,北京)[J]. 中国实用内科杂志,2018,38(9):796-813.
- [2] SYKORA J,POMAHAACOVA R,KRESLOVA M,et al. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol,2018,24(25):2741-2763.
- [3] 彭艳红. 溃疡性结肠炎中医病源流探析[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(3):138-139.
- [4] 钟捷,顾于蓓. 炎症性肠病发病机制与诊治新进展[J]. 内科理论与实践,2017,12(3):157-158.
- [5] 沈晨,张声生,崔超,等. 清肠化湿方治疗活动期溃疡性结肠炎近期疗效观察[J]. 北京中医药,2013,32(6):415-417,436.
- [6] ESSER C,RANNUG A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology,immunology, and toxicology[J]. Pharmacol Rev,2015,67(2):259-279.
- [7] ANDOH A,ZHANG Z,INATOMI O,et al. Interleukin-22,a member of the IL-10 subfamily,induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts[J]. Gastroenterology,2005,129(3):969-984.
- [8] LI Y,XIE HQ,ZHANG W,et al. Type 3 innate lymphoid cells are altered in colons of C57BL/6 mice with dioxin exposure[J]. Sci Total Environ,2019,662:639-645.
- [9] VANCAMELBEKE M,VERMEIRE S. The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol,2017,11(9):821-834.
- [10] 陆琳琳,沈洪,姚宏凤,等. 清肠化湿方对小鼠溃疡性结肠炎 th17/treg 平衡的调节作用[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(2):130-133.
- [11] COOPER HS,MURTHY SN,SHAH RS,et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest,1993,69(2):238-249.
- [12] LEPPKES M,NEURATH MF. Cytokines in inflammatory bowel diseases-Update 2020[J]. Pharmacol Res,2020,158:104835.
- [13] VELDHOEN M,HIROTA K,WESTENDORF AM,et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins[J]. Nature,2008,453(7191):106-109.
- [14] ESSER C,RANNUG A. The aryl hydrocarbon receptor in bar-

- rier organ physiology,immunology, and toxicology[J]. Pharmacol Rev,2015,67(2):259-279.
- [15] STEJSKALOVA L,VECEROVA L,PEREZ LM,et al. Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures[J]. Toxicol Sci,2011,123(1):26-36.
- [16] METIDJI A,OMENETTI S,CROTTA S,et al. The environmental sensor AHR protects from inflammatory damage by maintaining intestinal stem cell homeostasis and barrier integrity[J]. Immunity,2018,49(2):353-362.
- [17] PETER GUENGERICH F,MARTIN MV,MCCORMICK WA,et al. Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids *in vitro* and *in vivo*[J]. Arch Biochem Biophys,2004,423(2):309-316.
- [18] NGUYEN LP,BRADFIELD CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor[J]. Chem Res Toxicol,2008,21(1):102-116.
- [19] ARSENESCU R,ARSENESCU V,ZHONG J,et al. Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis,2011,17(5):1149-1162.
- [20] MONTELEONE I,RIZZO A,SARRA M,et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract[J]. Gastroenterology,2011,141(1):237-248.
- [21] PERNOMIAN L,DUARTE-SILVA M,DE BARROS CARDOSO CR. The aryl hydrocarbon receptor(AHR) as a potential target for the control of intestinal inflammation: Insights from an immune and bacteria sensor receptor[J]. Clin Rev Allergy Immunol,2020,59(3):382-390.
- [22] JI T,XU C,SUN L,et al. Aryl hydrocarbon receptor activation down-regulates IL-7 and reduces inflammation in a mouse model of DSS-induced colitis[J]. Dig Dis Sci,2015,60(7):1958-1966.
- [23] ESSER C,RANNUG A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology,immunology, and toxicology[J]. Pharmacol Rev,2015,67(2):259-279.
- [24] SCHULZKE JD,PLOEGER S,AMASHEH M,et al. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation[J]. Ann NY Acad Sci,2009,1165:294-300.
- [25] HOOPER LV,MACPHERSON AJ. Erratum:Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota[J]. Nat Rev Immunol,2015,15(5):329.
- [26] OSHIMA T,MIWA H,JOH T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis[J]. J Gastroenterol Hepatol,2008,23(S2):S146-S150.
- [27] JOHANSSON ME,GUSTAFSSON JK,HOLMEN-LARSSON J,et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis[J]. Gut,2014,63(2):281-291.
- [28] BOLTIN D,PERETS TT,VILKIN A,et al. Mucin function in inflammatory bowel disease[J]. J Clin Gastroenterol,2013,47(2):106-111.
- [29] SUN M,MA N,HE T,et al. Tryptophan (Trp) modulates gut homeostasis via aryl hydrocarbon receptor(AhR)[J]. Crit Rev Food Sci Nutr,2020,60(10):1760-1768.

(编辑:董宇)