

# 阿魏酸钠对溃疡性结肠炎小鼠肠道 NF- $\kappa$ B 表达和活性的影响

## The effects of sodium ferulate on the expression and the activity of NF- $\kappa$ B of the intestine of ulcerative colitis mice

姚君<sup>1</sup> 王建尧<sup>2</sup> 王立生<sup>1</sup> 张茹<sup>1</sup> 李迎雪<sup>1</sup> 徐正磊<sup>1</sup>

(1.暨南大学第二临床医学院/深圳市人民医院, 广东 深圳, 518020; 2.深圳市儿童医院, 广东 深圳, 518020)

中图分类号: R574.62 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860(2015)18-0087-04 证型: IDGB

**【摘要】**目的: 探讨阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)对溃疡性结肠炎治疗的可能相关机制。方法: 小鼠随机分4组空白对照(NC)组、模型(MD)组、低剂量(SFLD)、高剂量(SFHD)阿魏酸钠治疗组, NC组采用正常饮用水饲养, 采用5%葡聚糖硫酸钠(Dextran sulfate Sodium, DSS)制作UC小鼠模型, 造模7d成模后分为MD组、SFLD组和SFHD组, 予药物干预治疗后续7d。记录分析疾病活动指数(DAI)及脾脏指数(Spleen Index SI), 取结肠组织行HE染色; Western blot检测结肠NF- $\kappa$ B表达水平; ELISA法测小鼠肠粘膜NF- $\kappa$ B活性。结果: SFLD组、SFHD组小鼠第8~14d DAI明显低于MD组( $P<0.05$ ); SFLD组、SFHD组小鼠第14d SI明显低于MD组( $P<0.05$ ); MD组SI明显高于NC组( $P<0.05$ ); SFLD组、SFHD组结肠NF- $\kappa$ B表达和活性明显低于MD组; MD组结肠NF- $\kappa$ B表达和活性明显高于NC组( $P<0.05$ ); MD组NF- $\kappa$ B表达和活性明显高于NC组( $P<0.05$ )。结论: 阿魏酸钠可以通过降低结肠NF- $\kappa$ B表达及活性; 抑制脾脏代偿性增大, 从而减轻肠道的炎症反应及抑制脾脏的免疫反应, 改善UC全身炎症状态及免疫应答, 对UC发挥治疗作用。

**【关键词】** 溃疡性结肠炎; 阿魏酸钠; NF- $\kappa$ B

**【Abstract】** Objective: To investigate the mechanism of sodium in the treatment of ulcerative colitis. [Method] Mice were randomly divided into 4 groups: blank control (NC), model group (MD group), low dose SF group (SFLD), high dose SF group (SFHD). NC group with normal drinking water feeding, After 7 days of using 5% dextran sulfate sodium to make UC mouse model, the models with 7 days of drug intervention were divided into MD group, SFLD group and SFHD group. Record and analyze the disease activity index (DAI) and spleen index (Spleen Index SI), colon tissue were stained with HE; NF- $\kappa$ B expression of colon were detected by western blot; NF- $\kappa$ B activity of intestinal mucosal were measured by ELISA. Result: Among SFLD group and SFHD group of mice on days 8-14, DAI was significantly lower than that of MD group ( $P<0.05$ ); Among SFLD group and SFHD group of mice on 14 days, SI was significantly lower than that of MD group ( $P<0.05$ ); the SI of MD group was significantly higher than that of group NC ( $P<0.05$ ); Among SFLD group and SFHD group, the expression and activity of NF- $\kappa$ B in colon was significantly lower than that of MD group; the active of NF- $\kappa$ B expression in MD group was significantly higher than that in NC group ( $P<0.05$ ); the activity of NF- $\kappa$ B expression in MD group was higher than that in NC group ( $P<0.05$ ). Conclusion: Sodium ferulate can reduce the expression and activity of NF- $\kappa$ B of colon, inhibit the spleen's compensatory increase, relieve the inflammatory reaction of intestine, alleviate immune reaction of spleen, improve systemic inflammatory state and immune response of UC and play a role in the treatment of UC.

**【Keywords】** Ulcerative colitis; Sodium ferulate; NF- $\kappa$ B

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.18.045

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)为病因不明的慢性非特异性炎症性肠病, 相关表明 UC 发病可能与肠道粘膜屏障功能缺陷、异常免疫反应、感染、遗传和肠道微生态失调等有关<sup>[1]</sup>。阿魏酸钠是(化学名: 3-甲氧基-4 羟基-苯丙烯酸钠)(Sodium Ferulate, SF) 是一种新的非肽类内皮素受体拮抗剂, 可拮抗内皮素引起的血管收缩, 降低血管通透性、清除自由基; 抑制血小板集聚、改善血液循环; 抑制巨噬细胞活化, 抑制免疫过激; 并有一定的镇痛、解痉作用<sup>[2-6]</sup>。本研究通过观察阿魏酸钠对 DSS 诱导的 UC 小鼠模型 DAI、脾脏指数、病理组织学和肠道

NF- $\kappa$ B 蛋白表达和活性的变化, 进一步剖析 SF 相关治疗机制, 进而阐明 SF 有望成为治疗 UC 的新的治疗方案。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

实验动物选用 BALB / c 小鼠, 6~8 周龄, 均为雄性, 共 40 只, 为 SPF 级(购于南方医科大学实验动物中心, 合格证号: SCXK 粤 2006-0015)。每日标准饲养, 自由饮水及日常光照。

1.2 试剂

试剂阿魏酸钠及葡聚糖硫酸钠(分子量为 5000)购于广州斯佳公司。核蛋白抽提试剂盒购自 Fermentas 公司。NF-κB p65 转录因子试剂盒购自 Cayman 公司。Mouse NF-κB p65 Antibody 和 Mouse Histone H2 Antibody 购自 Santa Cruz 生物公司。Goat Anti Mouse IgG-HRP 购自北京中山生物技术有限公司。蛋白预染的彩色 marker 购自 Fermentas 公司。化学发光试剂盒购自 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠模型制作

取 6 周龄清洁级 BALB/c 雄性小鼠, 约 18~20 g。取 40 只小鼠造 UC 模型, 给予 5%DSS 作为饮用水, 共饲养 7 d 后, 换成无菌去离子水。

1.3.2 实验分组及药物干预

取 10 只正常小鼠作为空白对照组(NC 组), 30 只模型组随机分为 3 组: 分别为结肠炎组(MD 组)、低剂量 50 mg/kg (SFLD)、高剂量 150 mg/kg (SFHD) 阿魏酸钠治疗组。NC 组和 UC 组每日 1 次, 胃管注入 PBS 0.2 ml; SFLD 和 SFHD 胃管按分别按浓度 50 mg/kg 和 150mg/k 灌胃, 1 次/d; 4 组小鼠共干预 7 d。所有的小鼠禁食 8h, 摘眼球取外周血后, 脱颈处死。

1.4 观察指标

1.4.1 小鼠疾病活动指数(DAI)的评估按照 Murthy 评分系统<sup>[7]</sup>参考表 1。

表 1 小鼠疾病活动指数(DAI)的评估按照 Murthy 评分

| 分数 | 体重减轻率  | 粪便粘稠度         | 隐形/肉眼血便 |
|----|--------|---------------|---------|
| 0  | (-)    | 正常(颗粒状, 成形)   | 正常      |
| 1  | 1-5%   |               |         |
| 2  | 6-10%  | 松软(糊状, 不粘附肛门) | 潜血(+)   |
| 3  | 11-15% |               |         |
| 4  | >15%   | 腹泻(水样, 粘附肛门)  | 血便      |

表 1 疾病活动评分系统 DAI = (体重减轻率、粪便粘稠度和隐形/肉眼血便的总分) / 3

1.4.2 小鼠结肠炎病理学组织的评估

取新鲜结肠组织, 10%甲醛溶液固定, 行脱水、透明、浸蜡、包埋, 病理切片后, 行 HE 染色及镜下观察。

1.4.3 小鼠脾脏指数评估

取新鲜小鼠脾脏, 用生理盐水清洗, 吸干并称重, 以脾重量(mg)/体重(g)表示 SI<sup>[8]</sup>

1.4.4 Western blot 检测小鼠结肠组织 NF-κB 蛋白表达

Western blot 法检测 NF-κB (P65) 蛋白表达取小鼠结肠组织 50 mg 加入含有蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲液, 行组织匀浆后, 取上清行蛋白定量后取 50 μg 蛋白, 行聚丙烯凝胶电泳, 转移到 0.22 μm NC 膜, 5%脱脂牛奶溶于 TBS-T 后封闭 1 小时, 加入 NF-κB (P65) (1:500) 一抗与 NADPH (1:3000) 一抗, 4℃过夜, 二抗 (1:1000) 1h, 加入化学发光试剂和 X 线片显影。生物学图像分析系统按灰度值进行分析, 结果为目

的条带与内参条带灰度值的比值。

1.4.5 小鼠结肠组织 NF-κB P65 活性检测

ELISA 法检测, 将小鼠结肠组织 25 mg, 4℃生理盐水冰上用匀浆器匀浆, 在低温离心机 3500 r/min 离心 15 min 后, 取上清液。按试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理

实验数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。全部资料利用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 组间的比较采用单因素方差分析。P<0.05 为有统计学意义。

2.1 疾病活动指数评分(DAI)以及小鼠脾脏指数评分(SI)

2.1.1 从第 8 d 到第 14 d, 结肠炎小鼠出现明显的从糊状到液态血便、体重减轻以及贫血。SFLD、SFHD 组小鼠未出现明显血便, 粪便成形, 体重减轻较少。正常组 DAI 评分为 0。从第 10 d 到 14 d SFLD、SFHD 组相比结肠炎组 DAI 评分降低, 且有显著差异(P<0.05)。1~9 天 DAI 各组相比无差异(P>0.05) (表 3)。

2.1.2 小鼠脾脏指数

小鼠脾脏指数, SFLD 组与 MD 组相比 P<0.05, SFHD 组与 MD 组相比 P<0.05, 有统计学意义。

2.2 组织病理评估

与 NC 组(图 A)相比, MD 组(图 B)组织学特征为炎症急性期表现, 有粘膜水肿、糜烂及隐窝减少, 并有中性粒细胞侵入粘膜层和固有层。SFLD 组(图 C)和 SFHD 组(图 D)炎细胞浸润和腺上皮消失的情况明显低于模型组。(病理切片放大 200 倍)。

2.3 阿魏酸钠对 UC 小鼠结肠 NF-κB P65 蛋白表达活性影响

与 NC 组相比较 MD 组小鼠结肠组织中结肠 NF-κB P65 的蛋白表达以及活性显著升高(P<0.05); SFLD、SFHD 组与 MD 组相比较, 小鼠结肠组织 NF-κB P65 蛋白表达以及活性显著降低(P<0.05)如表 4

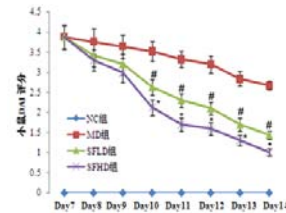


图 2 小鼠疾病活动指数

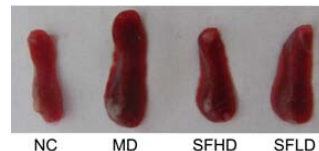


图 3 小鼠脾脏图

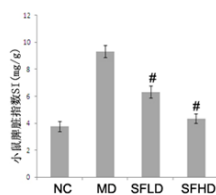


图 4 小鼠脾脏指数

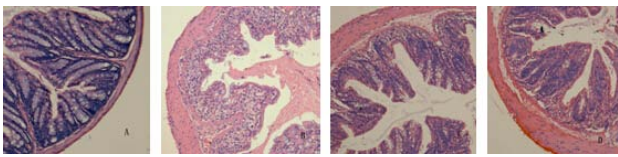


图 5 小鼠病理组织学

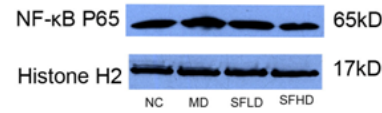


图 6 小鼠结肠 NF-kB P65 蛋白表达

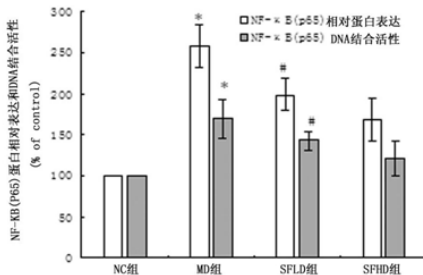


图 7 小鼠结肠 NF-kB P65 蛋白活性

### 3 讨论

近年来 UC 的发病率不断上升，是病因不明的结肠粘膜及粘膜下炎症改变为主要特点<sup>[9,10]</sup>。相关研究现就证明，NF-KB 是通过调节各种炎症基因转录的核转录因子，可以引发炎症的瀑布式反应，在 UC 发病机制中起非常重要的作用<sup>[11]</sup>；免疫功能的异常也是 UC 发生发展的重要因素之一<sup>[12]</sup>，许多免疫相关的细胞因子基因部位也均有 KB 位点，故 NF-kB 的活化可能是 UC 发生发展的关键点。

在本实验中，5%DSS 制造 UC 模型时，UC 小鼠出现血便、体重下降等相关症状，在造模连续 7 d 中 DAI 不断升高，组织病理学显示肠道粘膜呈急性炎症变化及粘膜受到广泛而严重的侵蚀，同时，SI 均持续高水平升高，肠道 NF-kB 蛋白表达及活性升高，以上变化都类似与人类 UC 病理生理学相关变化的特性。经过 SF 治疗后的 UC 小鼠在 DAI、病理学表现和 SI 上都得到了较好的改善，同时，更重要的是 SF 在抑制肠道 NF-kB 蛋白表达及活性，此外 RFHD 组治疗效果优于 LFLD 组，其相关机制值得进一步探讨。

对于 SF 治疗小鼠结肠炎可能具体机制如下：① DSS 诱导的 UC 小鼠模型存在肠道炎症改变引发的相关临床症状，SF 通过镇痛和解痉作用，一定程度的起到了改善小鼠相关症状及减少 DAI 的作用；能显著改善腹泻、便血等症状。②SF 通过可拮抗内皮素引起的血管收缩，改善肠道血管通透性并清除炎症反应引起的自由基增多<sup>[13]</sup>；从而在病理组织学上得到了较好的改善；由此得出 SF 有保护肠道黏膜，修复肠道组织的功能。③SF 可以抑制巨噬细胞活化、免疫过激<sup>[14]</sup>；从而缓解了结肠炎小鼠脾脏内因淋巴细胞存在显著的失衡而导致的脾脏指数增加。④NF-kB 是肠道炎症反应中关键信号分子，SF 可能本身存在良好的抗炎作用，不仅通过抑制 NF-kB 的炎症中心枢纽

作用<sup>[15]</sup>，而且抑制其调控的相关下游炎症因子所形成的负反馈通路，对整个 NF-kB 通路都起到了良好的抑制作用。SF 可能同时减少并抑制中性粒细胞和巨噬细胞渗出，缓解肠道增大的通透性和内皮细胞肿胀，并能调节肠道免疫，进一步缓解肠道炎症改变。⑤SF 可能通过改善肠道局部炎症和免疫情况，从而，对全身免疫紊乱起到了良好的调节作用，从改善的脾脏指数和 DAI，也再次反映了 SF 对疾病本身整体的恢复起到了良好的效果。⑥SF 作为中草药的提取物有着良好的毒性小、易吸收的特点，有其它药物并不能媲美的治疗优势，在剂量选择上，高剂量治疗效果优于低剂量。由此推断，口服 SF 通过对 UC 临床症状和肠道粘膜的改善，抑制肠道炎症及局部、全身免疫调节等作用，有望成为新一代治疗 UC 的新选择。

### 参考文献:

[1]郭俊宇,韦叶生,周喜汉,等. NF-KB 1 基因多态性与溃疡性结肠炎相关性研究[J]. 广东医学,2010, 31(6):724-726

[2] N enadis N ,Zhang, H -Y,Tsimidou,M. Z [J].Agric.Food Chem,2003, 51:1847-18 79

[3]王长芹,史永明,刘玉利,等.阿魏酸钠临床应用[J].中国临床医学杂志, 2008,9 (1):50-51.

[4]Ou S Y ,KWOK K C .Review ferulicacid:pharmaceutical f unctions preparation and applications i n foods[J].Journal o f the Science o f Food and Agriculture, 2004, 84(11):1261-1269.

[5]Fu Y .J,He M.Protective ef fect an d m echanism o f p harmacologic preconditioning i nduced b y s odium f erulate. A cta Pha rm Si n,2004,39(5): 325-327.

[6]刘少平,董卫国,吴东方,等.阿魏酸钠对结肠炎大鼠结肠组织一氧化氮合酶和环氧合酶的影响[J].中国药理学通报, 2003, 19(5): 571-74

[7]Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab Invest. 19 93, 6 9, 238-249.

[8]Sun, L. L, N ava, G . M , S tappenbeck,T. S . H ost genetic s usceptibility dysbiosis and viral triggers in inflammatory bowel disease[J]. Current opinion in gastroenterol ogy, 2011, 279(4):327-321

[9]Hirata I, Yasumoto S, Toshina K, Inoue T, Nishikawa T, Murano N, Murano M, Wang F Y, Katsu K. Evaluation of the effect of pyrrolidine dithiocarbamate in s uppress ing i nflammation i n mice w ith de xtran s odium s ulfate-induced colitis[J]. World journal of gastroenterology, 2007, 13, 1666-1671

[10]W ang Y,Zhao Y. I nfluence of Z uo gui y in o n a ntioxidation i n B lood Thymus and Spleen Index of Senile Mice[J].Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2007, 13, 67-68

[11]王群茹,蒋明德,吴晓玲,等.Toll 样受体 4、核转录因子-kB p65 在小鼠溃疡性结肠炎中的表达及意义[J].中国医药导报, 2012, 9(14):17-19.

[12]叶献词,吴正祥.蛋白酶激活受体 2、NF-kB 在溃疡性结肠炎肠黏膜的表达及其与肥大细胞相关性研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2009, 18(2):138-141.

[13]李军华,于皆平,何小飞,等.核因子-KB 在大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织的表达及其意义[J].2003,11(2):214-218.

[14]严明,欧阳静萍,刘永明,等.阿魏酸钠对 TNF- $\alpha$  致内皮细胞 NF- $\kappa$ B 和 ICAM-1 表达的影响[J].微循环杂志, 2001,11(4):7-8.

[15]刘少平,方春华,董元,等.阿魏酸钠对溃疡性结肠炎患者重要炎性免疫因子的影响[J].中国医药,2007, 2(9):541-543.

**基金项目:**

广东省医学科研基金(编号: B2013347)、广东省优博论文资助项目(SYBZZXM201318)与深圳市科技计划项目(编号: 201201013)。

**作者简介:**

姚君(1979-),女,山东,主治医师,博士,研究方向:消化道免疫与治疗。

王立生(1968-),男,通讯作者,主任医师,博士,研究方向:消化道疾病的诊治。

编辑:白莉 编号:EB-15032621(修回:2015-05-18)