

姜黄素对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜内NF- κ B及TNF- α 表达的影响

夏剑, 邓长生, 张明, 孙泽群, 姜华

夏剑, 邓长生, 张明, 孙泽群, 姜华, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

项目负责人: 夏剑, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院消化内科. jianjian_1998@sina.com

电话: 027-87330210

收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-11-25

摘要

目的: 观察姜黄素对小鼠溃疡性结肠炎的抗炎效果, 探讨其作用机制。

方法: 选 Balb/c 小鼠 40 只, 随机平均分为 4 组。A 组乙醇灌肠为阴性组, D 组噁唑酮(OXZ)灌肠为阳性组, C 组在 D 组基础上按 20 mg/kg 的姜黄素处理, B 组在 D 组基础上按 40 mg/kg 的姜黄素处理, 3 d 后进行炎症活动指数(DAI)、大体形态损伤、肠黏膜髓过氧化物酶(MPO)活性及组织学改变评分, 再用免疫组化 S-P 法检测组织标本 NF- κ B、TNF- α 的表达并评分。

结果: A 组 DAI、大体形态、组织学损伤、MPO、NF- κ B、TNF- α 的评分依次是 0.9 ± 0.74 、 1.6 ± 0.52 、 4.1 ± 1.10 、 0.8 ± 0.63 、 1.2 ± 0.65 、 1.3 ± 0.48 ; B 组 4.5 ± 0.85 、 3.3 ± 0.67 、 14.2 ± 1.40 、 1.5 ± 0.71 、 2.8 ± 0.79 、 2.6 ± 0.70 ; C 组 5.9 ± 0.99 、 4.2 ± 0.63 、 15.3 ± 1.64 、 1.7 ± 0.67 、 3.7 ± 0.95 、 3.9 ± 0.88 ; D 组 10.5 ± 0.97 、 6.8 ± 0.79 、 21.3 ± 1.49 、 3.7 ± 0.95 、 7.6 ± 1.43 、 8.1 ± 1.97 。经姜黄素处理的炎症小鼠炎症结肠肠黏膜内 NF- κ B 和 TNF- α 表达显著下降 ($P < 0.01$), 提示其结肠炎证明减轻。NF- κ B 与 TNF- α 的表达显著相关 ($r = 0.998$, $P < 0.01$)。

结论: 姜黄素是治疗溃疡性结肠炎的一种有效药物, 其机制可能是通过抑制 NF- κ B 的激活和 TNF- α 的表达而达到抗炎效果的。

夏剑, 邓长生, 张明, 孙泽群, 姜华. 姜黄素对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜内 NF- κ B 及 TNF- α 表达的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13(2): 255-257
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/255.asp

0 引言

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的病因与发病机制目前尚未完全明了, 但有研究证实细胞因子如 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 等在其发生和发展中起到重要作用, 他们能够诱导或激活多种炎症细胞和致炎因子, 引起肠黏膜的炎症反应, 而这些细胞因子的表达受到核因子- κ B (NF- κ B) 的调控. 在本病治疗上也在从抑制 NF- κ B 和某些细胞因子上寻求突破. 我们用姜黄素处理溃疡性结肠炎小鼠模型, 通过观察 NF- κ B 激活和 TNF- α 的表达情况, 来探讨姜黄素是否通过抑制 NF- κ B 的激活和 TNF- α 的表达而达到抗炎效果的。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 Balb/c 小鼠 40 只, 雌雄各半, 6-8 周龄, 体重 20-25 g, 由武汉大学医学院实验动物中心提供和饲养. 姜黄素和噁唑酮(OXZ)购自 Sigma 公司; 羊抗小鼠 NF- κ Bp65 多克隆抗体、羊抗小鼠 TNF- α 多克隆抗体、S-P 试剂盒和联苯胺检测试剂盒均购自北京中山试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 溃疡性结肠炎小鼠模型的制作 用噁唑酮法诱导小鼠溃疡性结肠炎, 将小鼠用乙醚麻醉, 经肛门插入一细导管, 距肛缘 4 cm, 缓缓注入 OXZ 溶液 150 μ L (6 mg, 溶于 500 mL/L 乙醇 150 μ L), 再将小鼠尾巴提起倒置约 30 s^[1]。

1.2.2 动物分组 A 组用 500 mL/L 乙醇灌肠后不作处理; B 组经噁唑酮诱导成功后, 第 2 d 腹腔注射姜黄素溶液 (0.8 mg, 溶于 25 mL/L 乙醇 1 000 μ L) 一次, 剂量为 40 mg/kg⁻¹; C 组诱导成功后第二日腹腔注射姜黄素溶液 (0.4 mg, 溶于 25 mL/L 乙醇 1 000 μ L) 一次, 剂量为 20 mg/kg; D 组诱导成功后不作处理。

1.2.3 结肠炎症的评价 在 3 d 后进行炎症活动指数 (DAI) 评分^[2], 而后处死小鼠取病变结肠进行大体形态损伤、组织学损伤评分及 MPO 活性测定. DAI 评分见表 1, DAI = (体重下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数) / 3; 正常大便成干而小粒状, 半稀便为糊状但不粘肛门, 稀便为液状而且粘肛门, 大便隐血用联苯胺法检测; 大体形态损伤按 Luk *et al* 标准 (表 2)^[3]; 组织学损伤按韩英 *et al* 标准^[4]; MPO 活性测定方法为取小鼠结肠组织 200 mg 加 2 g/L 十六烷基三甲基溴化铵 (HTAB) 1 mL, 以邻联茴香胺为底物, 用 UV-200 型紫外分光光度计于波长 655 nm 处测定 5 min 内吸光度 (A) 变化均值, 每分钟 A 值变化 1.0 为 1 个酶活性单位。

表1 DAI评分标准

记分	体重下降(%)	大便性状	便血
0	无	正常	阴性
1	1-5		
2	6-10	半稀便	隐血
3	11-15		
4	>15	稀便	肉眼血便

1.2.4 NF- κ B、TNF- α 表达的检测及评分 用免疫组化 S-P 法检测, 组织切片脱蜡; 将玻片置柠檬酸缓冲液用医用微波炉进行抗原修复, 水洗; 滴加 30 mL/L 的 H₂O₂ 室温 10 min 阻断内源性过氧化物酶, PBS 液冲洗; 正常

血清在室温下封闭 15 min, 清除多余血清; 滴加羊抗小鼠 NF- κ Bp65 多克隆抗体 37°C 孵育 1 h, PBS 冲液洗; 滴加生物素化的兔抗羊 Ig 抗体室温孵育 15 min, PBS 冲液洗; 滴加过氧化物酶标记的链酶亲和素室温孵育 15 min, PBS 液冲洗; DAB 显色 2-5 min, 苏木素复染后, 封片观察. TNF- α 的检测用羊抗小鼠 TNF- α 多克隆抗体替代羊抗小鼠 NF- κ Bp65 多克隆抗体即可. 免疫组化的切片在电镜下进行评分, A 组小鼠作阴性对照, 已知阳性片作阳性对照. 采用统一的染色积分评价标准: 染色强度分 4 级, 阴性染色 0 分; 弱阳性染色 1 分; 中度阳性染色 2 分; 强阳性染色 3 分. 每张切片按所见阳性细胞范围分 5 级, 阴性 0 分; 阳性细胞占 1-25% 的 1 分; 阳性细胞占 26-50% 的 2 分; 阳性细胞占 51-75% 的 3 分; 阳性细胞占 76-100% 的 4 分. 每张切片的评分为二者的乘积.

表 2 大体形态评分标准

记分	病理改变
0	无损伤
1	充血但没有溃疡
2	充血而且肠壁变厚但没有溃疡
3	有一处溃疡但没有肠壁的增厚
4	有两处或两处以上的溃疡/炎症
5	有两处或两处以上的大溃疡和炎症或者有一处溃疡/炎症沿结肠纵轴超过 1 cm
6-10	沿结肠纵轴的损伤超过 2 cm 以上每超过 1 cm 增加 1 分

统计学处理 评分以平均数±标准差 (mean ± SD) 表示. 用 2.0 版 SPSS 软件对正态分布的数据进行 *t* 检验, 采用 Spearman 法作等级相关分析.

2 结果

2.1 DAI 评分 小鼠在灌肠苏醒后 A 组基本活动如常, B、C、D 组逐渐出现懒动、拱背、厌食、体重下降、大便次数增多, 主要为稀便和脓血便. 但 B、C 组症状明显轻于 D 组. 评分示 B、C 组与 D 组比较差异有显著性 ($P < 0.01$), 说明姜黄素对噁唑酮诱导的结肠炎症具有治疗作用. 各组评分见表 3.

2.2 大体形态与组织损伤评分 噁唑酮诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型病变主要在近肛门段结肠, 可见结肠黏膜充血水肿、糜烂及溃疡形成, 部分肠段肠壁增厚. 以 D 组

病变最严重, 呈连续性分布, B、C 组病变明显减轻. 将病变组织切片经 HE 染色后, 镜下可见结肠黏膜溃疡及伪膜形成; 隐窝和黏蛋白减少或消失; 淋巴细胞和中性粒细胞浸润; 部分小鼠肠段还有纤维化形成. D 组尤为严重, 浸润深度可达固有层或以下, 而 B、C 组病变主要在黏膜层. 评分示 B、C 组与 D 组比较差异有显著性 ($P < 0.01$), B 组与 C 组比较也存在差异性 ($P < 0.05$). 可见姜黄素减轻结肠炎症可能存在剂量依赖性. 各组评分 (表 3).

2.3 MPO 活性测定 经姜黄素处理的小鼠 MPO 活性值明显下降, 评分示 B、C 组与 D 组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), 说明姜黄素可抑制溃疡性结肠炎的结肠炎症发展. 各组评分 (表 3).

2.4 NF- κ B 的表达 主要位于表面上皮、隐窝上皮细胞和巨噬细胞. A 组在胞质中偶有表达, B、C 组胞质中多呈棕黄色而胞核中为淡黄色, D 组胞质多为深棕黄色. TNF- α 表达多位于巨噬细胞、淋巴细胞的胞质, 呈黄褐色, D 组胞质的颜色明显深于 B、C 组. 评分示 B、C 组与 D 组比较差异有显著性 ($P < 0.01$), B 组与 C 组比较也存在差异性 ($P < 0.05$), 用 Spearman 等级相关法分析可见 TNF- α 与 NF- κ B 表达显著相关 ($r = 0.998 P < 0.01$), 各组评分 (表 3).

3 讨论

噁唑酮诱导成功的小鼠病变位于近肛门段大肠, 炎症局限在黏膜及黏膜下层, 表现为充血水肿、糜烂及溃疡, 镜下可见单核巨噬细胞浸润等. 在病理学和免疫学特征上均类似活动期 UC 患者.

UC 的发病是多因素、多机制作用的结果^[5], 其中免疫因素是主要因素之一, 而免疫因素中的细胞因子在 UC 的发生、发展中扮演着重要角色. 常见的有 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IFN、TNF- α 等, 我们的研究显示 UC 小鼠的肠黏膜 TNF- α 的表达明显增加. TNF- α 生物活性广泛, 他与细胞表面的 TNF 受体结合表现多种生物学功能而促进炎症的发生、发展, 主要表现在: (1) 激活中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞增强其吞噬功能, 本身释放的同时刺激细胞因子的释放如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IFN, 还通过刺激趋化蛋白-1 (MCP-1) 的合成及分泌而激活单核细胞等并诱导其趋化; (2) 刺激黏附分子的表达如细胞内黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、内皮细胞黏附分子-1 (ELAM-1)^[6], 介导炎症细胞的黏附; (3) 增

表 3 各项评分 (mean ± SD)

	DAI 评分	大体形态损伤评分	组织学损伤评分	MPO 值 (U/g)	NF- κ B 激活评分	TNF- α 表达评分
A	0.9 ± 0.74 ^{bd}	1.6 ± 0.52 ^{bd}	4.1 ± 1.10 ^{bd}	0.8 ± 0.63 ^{bd}	1.2 ± 0.65 ^{bd}	1.3 ± 0.48 ^{bd}
B	4.5 ± 0.85 ^{ad}	3.3 ± 0.67 ^{bd}	14.2 ± 1.40 ^{ad}	1.5 ± 0.71 ^b	2.8 ± 0.79 ^{ad}	2.6 ± 0.70 ^{bd}
C	5.9 ± 0.99 ^b	4.2 ± 0.63 ^d	15.3 ± 1.64 ^b	1.7 ± 0.67 ^b	3.7 ± 0.95 ^d	3.9 ± 0.88 ^b
D	10.5 ± 0.97	6.8 ± 0.79	21.3 ± 1.49	3.7 ± 0.95	7.6 ± 1.43	8.1 ± 1.97

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C 组; ^d $P < 0.01$ vs D 组.

强 T 细胞、B 细胞对抗原和丝裂原刺激的增生反应。最重要的是 TNF- α 可激活 NF- κ B。TNF- α 通过激活 IKKs (I κ Bs 激酶) 上游的激酶, 主要有 NF- κ B 诱导激酶 (NIK) 和丝裂原蛋白激酶的激酶-1 (MEKK1), 他们分别使 IKK1 和 IKK2 磷酸化而将他们激活, 后者使 I κ Bs (NF- κ B 抑制蛋白) 磷酸化, 进而泛素化, 最后被 26S 蛋白酶降解, 从而使 NF- κ B 的抑制解除^[7], 其 DNA 结合位点和核定位信号暴露, NF- κ B 移位到核内与相应位点结合, 促进多种促炎分子的转录, 主要有: (1) 细胞因子如 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、IFN 等, 已证实 TNF- α 启动子区有 3 个 NF- κ B 结合位点, IL-6、IL-8 各有一个^[8]; (2) 趋化蛋白如 MCP-1, 已证实 MCP-1 基因启动子部位含有结合 NF- κ B 的一个基因片段; (3) 黏附分子如 ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1、P 选择素、E 选择素等, 各黏附分子的增强子区均有 NF- κ B 结合位点; (4) 诱生型酶如 COX-2、iNOS 等^[9]; (5) 免疫性受体如 MHC-I、MHC-II、TCR α 、TCR β 、Ig κ 轻链等。NF- κ B 和 TNF- α 相互促进, 形成推进炎症发展的放大效应。

目前 UC 治疗主要集中在抑制机体免疫反应上, 这类药物疗效尚可, 但副作用较大, 不利于长期应用。姜黄素作为中成药毒副作用低, 已有研究证实他有抗炎作用, 且本次研究显示他确有显著的抗炎疗效, 经姜黄素作用的小鼠病变结肠黏膜内 TNF- α 的表达明显降低, 这与 Marion *et al* 研究的结果一致^[10]。姜黄素对 TNF- α 表达的抑制可能有两点: (1) 抑制促进 TNF- α 转录的 NF- κ B、AP-1 的活性, 从而减少 TNF- α 基因的转录^[11]; (2) 抑制 TNF- α 的活化信号途径中一系列的激酶和效应分子, 如蛋白激酶 C (PKC)、Jun 蛋白 N 端激酶 (JNK)、Src 激酶、MEKK-1、磷脂酶 A₂、溶血磷脂酶、G 蛋白和花生四烯酸等。有研究表明姜黄素通过与这些酶竞争结合位点而达到抑制这些激酶目的^[12]。另外, 经姜黄素作用的病变小鼠结肠黏膜内 NF- κ B 的激活也显著降低, 符合 Paul *et al* 的研究结果, 姜黄素可能从多阶段抑制 NF- κ B 的激活^[13]。首先, 抑制 NF- κ B 的部分激活信号或降低信号效应, 如细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 等)、脂多糖 (LPS)、佛波脂 (PMA) 及凝血酶等。其次, 抑制 NF- κ B 活化途径中的一些关键酶如 PKC、JNK、Src 激酶等^[14]。然后, 在 I κ Bs 磷酸化及 NF- κ B 向核内移位级联反应过程中, 姜黄素可抑制 MEKK-1、NIK 阻止 IKKs 的磷酸化, 并可直接与 IKKs 复合物结合抑制其活性^[15], 还可直接改变 NF- κ B 亚单位 N 端的 Rel 同源域 (RDH), 抑制其移位并暴露 RDH 的 I κ Bs 结合残端, 使 NF- κ B 易与 I κ Bs 结合从而被阻止活化。此外, 姜黄素还可抑制促进 NF- κ B 转录的 Egr-1 基因的表达^[16]。

总之, TNF- α 和 NF- κ B 在炎症的发生、发展过程中

扮演的重要角色。姜黄素很可能是通过抑制 TNF- α 表达和 NF- κ B 激活, 阻断炎症的放大效应而达到显著的抗炎效果, 从而可能成为治疗 UC 的一种有效药物。

4 参考文献

- 1 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazoline colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002;17:629-638
- 2 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702
- 3 Luk HH, Ko JK, Fung HS, Cho CH. Delineation of the protective action of zinc sulfate on ulcerative colitis in rats. *European J Pharmacol* 2002;443:197-204
- 4 韩英, 村田有志, 伊东重毫, 栋方昭博. 长期应用尼古丁对噁唑酮诱导的实验性小鼠肠炎模型的影响及其机制探讨. *中华消化杂志* 2001;21:473-476
- 5 邓长生, 夏冰. 炎症性肠病. 北京: 人民卫生出版社, 1998:4
- 6 Kumar A, Dhawan S, Hardegen NJ, Aggarwal BB. Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Pharmacol* 1998;55:775-783
- 7 Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280-288
- 8 Grandjean-Laquerriere A, Gangloff SC, Le Naour R, Trentesaux C, Hornebeck W, Guenounou M. Relative contribution of NF- κ B and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by keratinocytes. *Cytokine* 2002;18:168-177
- 9 Chen Y, Yang L, Lee TJ. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- κ B activation. *Biochem Pharmacol* 2000;59:1445-1457
- 10 Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1551-1556
- 11 Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res* 1999;39:41-47
- 12 Hasmeda M, Polya GM. Inhibition of cycle AMP-dependent protein kinase by curcumin. *Phytochemistry* 1996;42:599-605
- 13 Brennan P, O'Keefe LA. Inhibition of nuclear factor κ B by direct modification in whole cells-mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers. *Biochem Pharmacol* 1998;55:965-973
- 14 Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumann M. Curcumin blocks NF- κ B and the mitogenic response in Helicobacter pylori-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:1065-1072
- 15 Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Comparative Studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B Kinase and NF- κ B activation in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1665-1676
- 16 Han SS, Chung ST, Robertson DA, Ranjan D, Bondada S. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-XL, NF- κ B, and P53. *Clin Immunol* 1999;93:152-161