

基于 miR-34a/SIRT1 轴探讨奥沙拉秦钠治疗溃疡性结肠炎的作用机制

江巧丽 朱佳杰 戴蕾 罗灵和 杨珠莹

【摘要】目的 探讨奥沙拉秦钠对溃疡性结肠炎的治疗效果及其与微小 RNA-34a/沉默信息调节因子 1(SIRT1)(miR-34a/SIRT1)轴在氧化应激方面的可能作用机制。**方法** 80 只雄性小鼠随机分为对照组、模型组、(奥沙拉秦钠)低、中、高剂量组、阴性转染组、miR-34a 过表达组、高剂量 +miR-34a 过表达组(HG 组),每组各 10 只。观察各组小鼠生长情况并计算疾病活动指数(DAI)评分;采用 HE 染色检测小鼠结肠组织病理变化并计算病理 HI 评分;qRT-PCR 法检测小鼠结肠组织中 miR-34a、SIRT1 mRNA 表达水平;硝酸还原酶法检测各组小鼠结肠组织氧化应激水平;ELISA 法检测各组小鼠血清炎症因子水平;Western blot 法检测小鼠结肠组织中 SIRT1 蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比,模型组小鼠 DAI 评分、HI 评分、结肠组织中 miR-34a 表达水平、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、一氧化氮(NO)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平、血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 水平均明显升高(均 $P < 0.05$),结肠组织中 SIRT1 mRNA、蛋白表达、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。与模型组相比,低、中、高剂量组小鼠 DAI 评分、HI 评分、结肠组织中 miR-34a 表达水平、MDA、MPO、NO、iNOS 水平、血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 表达水平均明显降低,结肠组织中 SIRT1 mRNA、蛋白表达、SOD、GSH-Px 水平均明显升高(均 $P < 0.05$)。与高剂量组相比,低、中剂量组小鼠 DAI 评分、HI 评分、结肠组织中 miR-34a 表达水平均明显升高,结肠组织中 SIRT1 mRNA 表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$),miR-34a 过表达组与 HG 组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 表达水平及结肠组织 miR-34a 表达水平均明显升高,结肠组织 SOD、GSH-Px 水平及 SIRT1 蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。与阴性转染组相比,miR-34a 过表达组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 表达水平及结肠组织 miR-34a 表达水平均明显升高,结肠组织 SOD、GSH-Px 水平及 SIRT1 蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。**结论** 奥沙拉秦钠可下调 miR-34a 并上调 SIRT1 表达,进而有效抑制溃疡性结肠炎小鼠氧化应激反应及炎症反应实现治疗目的。

【关键词】 溃疡性结肠炎 奥沙拉秦钠 微小 RNA-34a 沉默信息调节因子 1

Efficacy of olsalazine sodium intreatment of ulcerative colitis in mice and its relation with miR-34a/SIRT1 axis JIANG Qiaoli, ZHU Jiajie, DAI Lei, et al. Department of Gastroenterology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China

【Abstract】Objective To investigate the therapeutic effect of olsalazine sodium on ulcerative colitis and its relation with miR-34a/silence information regulator 1 (SIRT1) (miR-34a/SIRT1) axis. **Methods** Eighty male mice were randomly divided into control group, model group and low, medium, high dose olsalazine sodium treatment groups, negative transfection group, miR-34a over-expressed group and HG group (high dose+over-expression miR-34a) with 10 mice in each group. The growth of mice was observed and the DAI score was calculated; hematoxylin-eosin (HE) staining was used to examine the pathological changes of colon tissues and HI scores were calculated; real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expressions of miR-34a and SIRT1 in colon tissues; the oxidative stress level in colon tissues was detected; the levels of inflammatory factors in serum were detected; the expression of SIRT1 protein in colon tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the DAI score, HI score, the expression level of miR-34a, levels of MDA, MPO, NO, iNOS, serum IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-8 in colon tissue of the model group mice were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of SIRT1 mRNA and protein, levels of SOD and GSH-Px in colon tissue were significantly decreased($P < 0.05$). Compared with

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.23.2019-2079

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2017ZA029)

作者单位:310012 杭州,浙江省立同德医院消化科

通信作者:杨珠莹,E-mail:rachel_129@163.com

the model group, the DAI score, HI score, the expression level of miR-34a, levels of MDA, MPO, NO, iNOS, levels of serum IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-8 in colon tissue of the low, middle and high dose olsalazine sodium groups decreased significantly ($P < 0.05$), while the expression levels of SIRT1 mRNA and protein, levels of SOD and GSH-Px in colon tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the high dose group, the DAI score, HI score and the expression level of miR-34a of mice of the low and middle dose groups were significantly higher ($P < 0.05$), while the expression level of SIRT1 mRNA was significantly lower ($P < 0.05$); the levels of MDA, MPO, NO, iNOS, the levels of serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 and the expression level of miR-34a in colon tissue of mice in over-expression group and HG group were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of SOD, GSH-Px and SIRT1 protein in colon tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the negative transfection group, the levels of MDA, MPO, NO, iNOS, the levels of serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 and the expression level of miR-34a in colon tissue of mice in miR-34a overexpressed group increased significantly ($P < 0.05$), while the levels of SOD, GSH-Px and SIRT1 protein in colon tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Olsalazine sodium can down-regulate the expression of miR-34a and up-regulate the expression of SIRT1, then effectively inhibit oxidative stress and inflammation in mice with ulcerative colitis.

【Key words】 Ulcerative colitis Olsalazine sodium Micro RNA-34a Silence information regulator 1

溃疡性结肠炎是一种肠道疾病,病程较长,同时具有易复发甚至癌变等特点,严重影响患者生活质量及身心健康^[1]。溃疡性结肠炎所致的肠道炎性反应环境,会导致活性氧及活性氮含量明显增加进而引发氧化应激反应,最终加重病变严重程度^[2]。传统抗结肠炎药物 5-氨基水杨酸与新型生物制剂均可提高炎症性肠病疗效,但由于溃疡性结肠炎病因尚未完全明确,治疗效果尚不理想。奥沙拉秦钠是当前治疗溃疡性结肠炎常用的药物,不仅效果较好,且不良反应少,已在临床推广应用,但关于其具体作用机制及通过调控哪些信号通路发挥作用均未明确^[3]。有研究表明微小 RNA-34a(miRNA-34a, miR-34a) 表达水平降低可缓解肝细胞氧化应激损伤并发挥保护作用^[4]。相关研究报道沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)是 miR-34a 靶基因,人晶状体上皮细胞氧化应激反应中 miR-34a 表达水平上调并可通过下调靶基因 SIRT1 表达进而促进氧化应激反应发生^[5]。由此猜测 miR-34a/SIRT1 途径与氧化应激反应密切相关。因此,本研究通过建立溃疡性结肠炎小鼠模型,探讨奥沙拉秦钠对溃疡性结肠炎的治疗效果及其与 miR-34a/SIRT1 轴在氧化应激方面的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性小鼠 80 只,体重 20~30g,购自浙江大学实验动物中心,许可证号:SYXK(浙)2017-0023。所有小鼠在温度 21~26 $^{\circ}$ C、湿度 45%~56% 环境下适应性饲养 3 周,每天光照 12h,白昼交替。

1.2 主要试剂与仪器 奥沙拉秦钠胶囊购自天津力生物制药股份有限公司(批号:20160218,规格:0.25g); Lipofectamine2000(批号:170618)与 Trizol 试剂(批号:

170521)均购自美国 Invitrogen 公司;阴性转染质粒与 pHLV-U6-ZsGreen-Puro 载体均购自上海吉凯基因技术有限公司;miR-34a 过表达载体混合溶液由本实验室构建并保存;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)(批号:20161221)购自美国 Sigma 公司;反转录与 SYBRTM GreenERTM Kit 试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公司;兔抗鼠 SIRT1 抗体(批号:8469)购自美国 CST 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号:20170416)购自北京博尔西科技有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)(批号:20170312)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)(批号:20170321)、髓过氧化物酶(MPO)(批号:20170411)、NO(批号:20170310)、一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)(批号:20170312)、谷胱甘肽-过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)(批号:20160413)试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司;IL-1 β (批号:20160111)、IL-6(批号:20160216)、TNF- α (批号:20160213)、IL-8(批号:20160318)、ELISA 试剂盒均购自北京雅安达生物技术有限公司;PBS 缓冲液(批号:20170412)购自上海远慕生物科技有限公司。qRT-PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;DS-U3 型凝胶成像分析系统购自日本 Nikon 公司;Image-proplus 6.0 分析软件均购自美国 Media Cybernetics 公司;Eclipse CI 型正置光学显微镜购自南京斯高谱仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 溃疡性结肠炎小鼠模型建立、给药及分组 小鼠适应性饲养 5d 后随机选取 10 只小鼠为对照组,对其余 70 只小鼠采用 TNBS 法建立溃疡性结肠炎小鼠模型,具体方法为小鼠禁食 24h 后分别注射 40mg/kg 戊巴比妥钠,0.6ml TNBS 溶于 0.25ml 乙醇溶液中,制作橡胶

软管插入小鼠肛门(深度为 8cm),将上述混合液经注射器注入橡胶软管,将小鼠倒立 30s 后,平放使其自然恢复。参照杨强^[6]报道的实验方法,建立溃疡性结肠炎小鼠模型。按照随机数字表法将造模成功的 70 只小鼠分为模型组、(奥沙拉秦钠)低、中、高剂量组、阴性转染组、miR-34a 过表达组和奥沙拉秦钠高剂量+miR-34a 过表达组(HG 组)7 组,每组 10 只。奥沙拉秦钠胶囊研磨后用 100 目筛过滤,与蒸馏水配制成质量浓度为 50mg/ml(低)、100mg/ml(中)、150mg/ml(高)混悬奥沙拉秦钠药液,置于 4℃冰箱保存。低、中、高剂量组分别给予 227.5、455.0、682.5mg/kg 奥沙拉秦钠药液灌胃,灌胃体积均为 4.55ml/kg,奥沙拉秦钠剂量相当于成人治疗剂量 1.5g/d、3.0g/d、4.5g/d 的 9.1 倍^[7]。阴性转染组在小鼠尾部静脉注射 100 μ l 阴性转染质粒;模型组与对照组均在小鼠尾部注射 100 μ l PBS;miR-34a 过表达组在小鼠尾部静脉注射 100 μ l miR-34a 过表达载体混合溶液;HG 组在小鼠尾部静脉注射 100 μ l miR-34a 过表达载体混合溶液;均连续给药 10d。对照组、模型组、低、中、高剂量组 5 组观察比较奥沙拉秦钠对小鼠结肠组织病理学和 miR-34a、SIRT1 mRNA 表达水平的影响;对照组、模型组、高剂量组、阴性转染组、miR-34a 过表达组、HG 组 6 组小鼠观察比较奥沙拉秦钠对小鼠结肠组织氧化应激水平、血清炎症因子表达水平和结肠组织中 miR-34a、SIRT1 表达水平的影响。

1.3.2 结肠组织病理变化观测 根据小鼠日常活动参照相关文献^[8]报道进行疾病活动指数(DAI)评分评定。连续给药 10d 后禁食 1d,于第 12 天处死小鼠并剪开小鼠腹腔,沿结肠与远端回肠切取整个肠段,采用 0.9%氯化钠溶液冲洗,展开结肠组织并仔细观察。切取病变结肠组织,约 0.11g,常规固定后制备石蜡切片,采用 HE 染色观察结肠组织病变,光镜下观察结肠组织学变化,按照组织学损伤程度进行病理评分(HI)^[9]。

1.3.3 结肠组织中 miR-34a、SIRT1 mRNA 表达水平检测 采用 qRT-PCR 法。给药处理 12d 后,颈部脱臼处死小鼠,采集对照组、模型组、低、中、高剂量组小鼠结肠组织,液氮中研磨结肠组织,加入 10 μ l Trizol 试剂提取总 RNA,反转录,qRT-PCR 法检测小鼠结肠组织中 miR-34a、SIRT1 mRNA 表达水平。反应条件:95℃ 5min,95℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 30s,共 40 个循环。miR-34a 以 U6 为内参基因,SIRT1 以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 相对定量法计算 miR-34a、SIRT1 mRNA 的相对表达量。

1.3.4 结肠组织氧化应激水平检测 采用硝酸还原酶

法。取各组小鼠冻存结肠组织,采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 水平;硫代巴比妥酸反应产物比色法检测 MDA 水平;采用硝酸还原酶法检测 NO 水平;采用髓过氧化物酶检测 MPO 水平;按照 iNOS 检测试剂盒检测 iNOS 水平;采用酶促反应计算 GSH-Px 水平。

1.3.5 血清炎症因子表达水平检测 采用 ELISA 法。给药处理 12d 时采用脱颈法处死小鼠,并采用心脏取血法采集小鼠血液样本置于离心管内,3 000r/min 离心 15min,取上血清置于-80℃超低温冰箱保存,采用 ELISA 法检测各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 表达水平。

1.3.6 结肠组织中 SIRT1 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。取 50mg 小鼠结肠组织并加入蛋白裂解液提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳反应分离蛋白,移至 PDVF 膜,脱脂奶粉封闭,2h 后加入 SIRT1 一抗(稀释比均为 1:1 000),置于 4℃冰箱孵育过夜,次日加入二抗(稀释比 1:10 000),ECL 显影后置于凝胶分析系统观察蛋白条带,采用 Image-proplus6.0 图像分析系统分析蛋白条带积分光密度值,SIRT1 蛋白相对表达量=SIRT1 蛋白条带积分光密度值/GADPH 条带积分光密度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 或 SNK-*q* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组小鼠结肠组织病理变化比较 与对照组小鼠相比,模型组小鼠结肠黏膜明显充血、水肿且结肠长度缩短;与模型组小鼠相比,奥沙拉秦钠低、中、高剂量组结肠外观明显改善,见图 1(插页)。HE 染色显示对照组小鼠结肠组织黏膜完整且腺体结构均呈排列整齐,没有出现明显溃疡现象;与对照组小鼠相比,模型组小鼠结肠黏膜出现缺损且腺体结构出现分离,同时出现中性粒细胞浸润;低剂量组与模型组相似,中剂量组小鼠结肠黏膜出现一定缺损及隐窝损伤,中性粒细胞浸润明显减少且可见部分腺体结构;与模型组相比,高剂量组小鼠结肠组织结构与腺体结构均较为完整,仅见少量中心粒细胞浸润,未见隐窝损伤,见图 2(插页)。与对照组相比,模型组、低、中、高剂量组小鼠 DAI 评分与 HI 评分均明显升高(均 $P<0.05$);与模型组相比,低、中、高剂量组小鼠 DAI 评分与 HI 评分均明显降低(均 $P<0.05$);与高剂量组相比,低、中剂量组小鼠 DAI 评分与 HI 评分均明显升高(均 $P<0.05$),见表 1。

表 1 5 组小鼠 DAI、HI 评分比较(分)

组别	n	DAI 评分	HI 评分
低剂量组	10	2.32 ± 0.33 ^{△▲}	7.56 ± 0.57 ^{△▲}
中剂量组	10	2.21 ± 0.47 ^{△▲}	7.49 ± 1.14 ^{△▲}
高剂量组	10	1.52 ± 0.31 [△]	3.91 ± 0.59 [△]
模型组	10	2.61 ± 0.25 [*]	9.85 ± 0.71 [*]
对照组	10	0	0
P 值		<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较,[△]*P*<0.05;与高剂量组比较,[▲]*P*<0.05

2.2 5 组小鼠结肠组织中 miR-34a、SIRT1 mRNA 表达水平的比较 与对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平明显升高,SIRT1 mRNA 表达水平明显降低(均 *P*<0.05);与模型组相比,奥沙拉秦钠低、中、高剂量组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平均明显降低,SIRT1 mRNA 表达水平均明显升高(均 *P*<0.05);与高剂量组相比,低、中剂量组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平均明显升高,SIRT1 mRNA 表达水平均明显降低(均 *P*<0.05)。见表 2。

表 2 5 组小鼠结肠组织中 miR-34a、SIRT1 mRNA 表达水平的比较

组别	n	miR-34a	SIRT1 mRNA
低剂量组	10	2.56 ± 0.52 ^{△▲}	1.26 ± 0.22 ^{△▲}
中剂量组	10	2.47 ± 0.62 ^{△▲}	1.28 ± 0.36 ^{△▲}
高剂量组	10	1.26 ± 0.19 [△]	1.68 ± 0.43 [△]
模型组	10	3.52 ± 0.57 [*]	0.34 ± 0.08 [*]
对照组	10	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.06
P 值		<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较,[△]*P*<0.05;与高剂量组比较,[▲]*P*<0.05

2.3 6 组小鼠结肠组织氧化应激水平的比较 与对照组相比,模型组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平均明显升高,SOD、GSH-Px 水平均明显降低(均 *P*<0.05);与模型组相比,高剂量组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平均明显降低,SOD、GSH-Px 水平均明显升高

表 3 6 组小鼠结肠组织氧化应激水平的比较

组别	n	MDA(nmol/mgpr)	MPO(U/g)	NO(μmol/gpr)	iNOS(U/mgpr)	SOD(U/mgpr)	GSH-Px(U/mgpr)
高剂量组	10	5.16 ± 0.43 [△]	0.85 ± 0.16 [△]	1.65 ± 0.31 [△]	2.66 ± 0.35 [△]	79.96 ± 6.17 [△]	864.57 ± 52.37 [△]
阴性转染组	10	8.58 ± 0.76	3.14 ± 0.67	3.63 ± 0.47	4.26 ± 0.56	54.12 ± 4.06	606.57 ± 68.42
miR-34a 过表达组	10	12.14 ± 0.67 ^{▲*}	4.45 ± 0.29 ^{▲*}	5.52 ± 0.42 ^{▲*}	5.58 ± 0.71 ^{▲*}	34.16 ± 2.29 ^{▲*}	302.41 ± 66.58 ^{▲*}
HG 组	10	9.16 ± 0.59 [▲]	2.16 ± 0.48 [▲]	3.14 ± 0.17 [▲]	3.35 ± 0.14 [▲]	46.97 ± 1.08 [▲]	516.47 ± 35.52 [▲]
模型组	10	8.54 ± 0.71 [*]	3.12 ± 0.51 [*]	3.65 ± 0.31 [*]	4.29 ± 0.16 [*]	53.31 ± 3.32 [*]	600.34 ± 72.52 [*]
对照组	10	4.32 ± 0.41	0.71 ± 0.46	1.32 ± 0.11	2.42 ± 0.12	88.69 ± 5.41	942.36 ± 29.17
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较,[△]*P*<0.05;与高剂量组比较,[▲]*P*<0.05;与阴性转染组比较,[#]*P*<0.05

(均 *P*<0.05);与高剂量组相比,miR-34a 过表达组与 HG 组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平均明显升高,SOD、GSH-Px 水平均明显降低(均 *P*<0.05);与阴性转染组相比,miR-34a 过表达组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平均明显升高,SOD、GSH-Px 水平均明显降低(均 *P*<0.05)。见表 3。

2.4 6 组小鼠血清炎症因子表达水平的比较 与对照组相比,模型组小鼠 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-8 表达水平均明显升高(均 *P*<0.05);与模型组相比,高剂量组 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-8 表达水平均明显降低(均 *P*<0.05);与高剂量组相比,miR-34a 过表达组与 HG 组 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-8 表达水平均明显升高(均 *P*<0.05);与阴性转染组相比,miR-34a 过表达组 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-8 表达水平均明显升高(均 *P*<0.05)。见表 4。

2.5 6 组小鼠结肠组织中 miR-34a、SIRT1 mRNA、蛋白表达水平的比较 与对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平明显升高,SIRT1 mRNA 及蛋白表达水平均明显降低(均 *P*<0.05);与模型组相比,高剂量组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平均明显降低,SIRT1 mRNA 及蛋白表达水平均明显升高(均 *P*<0.05);与高剂量组相比,miR-34a 过表达组与 HG 组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平均明显升高,SIRT1 mRNA 及蛋白表达水平均明显降低(均 *P*<0.05);与阴性转染组相比,miR-34a 过表达组 miR-34a 表达水平均明显升高,SIRT1 mRNA 及蛋白表达水平均明显降低(均 *P*<0.05),见图 3、表 5。

3 讨论

溃疡性结肠炎病变部位位于直肠与结肠黏膜层,其病理学变化主要为炎症、糜烂及溃疡,患者临床表现为腹泻、腹痛及黏液脓血便等,随着病情严重程度加重可能发展为结肠癌^[10]。溃疡性结肠炎病因尚未明确且临床缺乏特异性治疗方法,因而如何控制溃疡性结肠炎进展并减少患者复发率成为当前研究难点。因此,积极

表 4 6 组小鼠血清炎症因子表达水平的比较(pg/ml)

组别	n	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-8
高剂量组	10	130.31 \pm 15.37 Δ	171.48 \pm 15.65 Δ	340.27 \pm 22.62 Δ	322.46 \pm 21.17 Δ
阴性转染组	10	315.24 \pm 16.58	313.42 \pm 18.75	663.55 \pm 23.82	472.69 \pm 23.38
miR-34a 过表达组	10	451.53 \pm 18.95 $\Delta\#$	363.46 \pm 20.03 $\Delta\#$	726.35 \pm 26.08 $\Delta\#$	519.43 \pm 20.06 $\Delta\#$
HG 组	10	258.49 \pm 19.34 Δ	279.68 \pm 16.57 Δ	513.43 \pm 22.16 Δ	446.15 \pm 15.67 Δ
模型组	10	312.34 \pm 15.25 Δ	310.27 \pm 13.20 Δ	675.42 \pm 29.31 Δ	487.25 \pm 22.31 Δ
对照组	10	96.12 \pm 12.63	112.34 \pm 12.46	285.47 \pm 26.23	252.31 \pm 12.35
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* P <0.05;与模型组比较, Δ P <0.05;与高剂量组比较, Δ P <0.05;与阴性转染组比较, $\#$ P <0.05

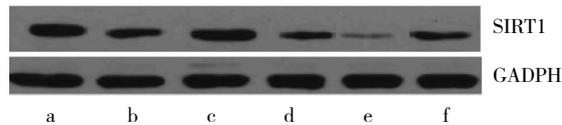


图 3 6 组小鼠结肠组织中 SIRT1 蛋白电泳图

表 5 奥沙拉秦钠对转染小鼠结肠组织中 miR-34a、SIRT1 表达水平的影响

组别	n	miR-34a	SIRT1 mRNA	SIRT1 蛋白
高剂量组	10	1.26 \pm 0.19 Δ	2.48 \pm 0.43 Δ	0.69 \pm 0.16 Δ
阴性转染组	10	3.45 \pm 0.46	0.35 \pm 0.07	0.35 \pm 0.10
miR-34a 过表达组	10	4.16 \pm 0.32 $\Delta\#$	0.22 \pm 0.03 $\Delta\#$	0.20 \pm 0.02 $\Delta\#$
HG 组	10	2.31 \pm 0.20 Δ	1.25 \pm 0.11 Δ	0.33 \pm 0.09 Δ
模型组	10	3.52 \pm 0.57 Δ	0.34 \pm 0.08 Δ	0.32 \pm 0.08 Δ
对照组	10	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.06	0.85 \pm 0.11
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* P <0.05;与模型组比较, Δ P <0.05;与高剂量组比较, Δ P <0.05;与阴性转染组比较, $\#$ P <0.05

寻找溃疡性结肠炎治疗药物成为热点研究问题。

奥沙拉秦钠可有效治疗反复发作型溃疡性结肠炎并可缓解患者临床症状,其作用效果明显优于柳氮磺吡啶等药物,同时患者胃肠道不良反应发生率均明显降低^[11-12]。本研究通过建立溃疡性结肠炎小鼠模型,采用 HE 染色法观察奥沙拉秦钠对小鼠结肠组织病理学的影响,结果显示低、中、高剂量组 DAI 评分与 HI 评分均低于模型组并可有效改善结肠外观充血水肿现象,说明奥沙拉秦钠有助于减缓溃疡性结肠炎小鼠病理症状并减轻肠道黏膜损伤,提示奥沙拉秦钠可有效治疗溃疡性结肠炎,与临床研究相似。miR-34a 表达水平与氧化应激损伤程度密切相关,随着氧化应激反应加剧 miR-34a 表达水平明显升高并可加重机体氧化应激损伤^[3]。机体受到氧化应激损伤时 SIRT1 蛋白可通过减少细胞凋亡进而发挥抗氧化应激反应功能^[14]。研究发现白内障大鼠中 miR-34a 表达水平升高可抑制靶基因 SIRT1 表达并加重机体氧化应激损伤,进而促进白内障

发生^[5]。本研究结果显示模型组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平高于对照组,而 SIRT1 表达水平明显降低,高剂量组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平明显降低,SIRT1 表达水平明显升高,说明 miR-34a/SIRT1 途径参与溃疡性结肠炎发生过程,奥沙拉秦钠干预后可能通过降低 miR-34a 表达水平并上调 SIRT1 表达进而发挥抗氧化作用。提示奥沙拉秦钠可有效治疗溃疡性结肠炎小鼠,其可能通过调控 miR-34a/SIRT1 途径发挥作用。

溃疡性结肠炎所致肠道炎症损伤与氧化应激反应密切相关,活性氧自由基大量释放或抗氧化系统功能减弱均可造成组织损伤,MDA 含量越高预示溃疡性结肠炎大鼠体内脂质过氧化程度及细胞氧化程度加重,MPO 含量增加直接反映肠道炎症细胞浸润及炎症反应程度并可作为评估肠道炎症严重程度的重要指标,同时肠道中性粒细胞及巨噬细胞均可产生诱导型 iNOS 进而促使 NO 生成量增加,NO 又可进一步促进炎症反应并造成细胞出现不同程度损伤,同时抗氧化系统中 SOD 与 GSH-Px 均具有抗氧化及抑制溃疡性结肠炎肠组织脂质过氧化等重要作用^[16-18]。本研究为了进一步探究奥沙拉秦钠是否通过调控 miR-34a/SIRT1 途径发挥作用,同时奥沙拉秦钠高剂量对溃疡性结肠炎的治疗效果最为明显,因而本研究构建 miR-34a 过表达载体并将其经注射器注入奥沙拉秦钠高剂量小鼠中,比较分析各组小鼠结肠组织氧化应激水平,结果显示模型组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平均明显高于对照组,SOD、GSH-Px 水平均明显降低;高剂量组小鼠结肠组织 MDA、MPO、NO、iNOS 水平均明显低于模型组、miR-34a 过表达组、HG 组,而 SOD、GSH-Px 水平均明显升高,说明奥沙拉秦钠可通过抑制 miR-34a 表达并上调 SIRT1 表达进而促使 SOD、GSH-Px 活性升高并增强溃疡性结肠炎小鼠抗氧化系统。提示奥沙拉秦钠可通过调控 miR-34a/SIRT1 途径进而抑制溃疡性结肠炎小鼠结肠组织氧化应激反应。溃疡性结肠炎小鼠

肠组织炎症反应加剧,其中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 等释放量增加并可进一步诱发周围组织损伤^[19-20]。本研究结果显示模型组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 水平均明显高于对照组,高剂量组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 水平均明显低于模型组、miR-34a 过表达组、HG 组,说明奥沙拉秦钠可降低溃疡性结肠炎小鼠炎症反应,其可能通过抑制 miR-34a 表达并间接上调 SIRT1 表达发挥作用。同时本研究检测各组小鼠结肠组织 miR-34a、SIRT1 表达水平,结果发现模型组小鼠结肠组织中 miR-34a 表达水平高于对照组,SIRT1 表达水平明显降低;高剂量组 miR-34a 表达水平明显低于模型组、miR-34a 过表达组、HG 组,而 SIRT1 表达水平均明显升高,进一步证实奥沙拉秦钠可调控 miR-34a/SIRT1 途径,提示奥沙拉秦钠可通过调控 miR-34a/SIRT1 途径进而抑制溃疡性结肠炎小鼠肠道组织炎症反应及氧化应激反应。

综上所述,本研究通过建立溃疡性结肠炎小鼠模型并应用奥沙拉秦钠治疗,初步证实奥沙拉秦钠基于 miR-34a/SIRT1 轴治疗溃疡性结肠炎的作用机制。进一步研究奥沙拉秦钠基于 miR-34a/SIRT1 轴治疗溃疡性结肠炎的作用效点及其与其他信号通路的可能作用机制均具有重要意义。今后将从分子水平及药代动力学角度分析奥沙拉秦钠治疗溃疡性结肠炎的有效性。

4 参考文献

- [1] Narula N, Kassam Z, Yuan Y, et al. Systematic Review and Meta-analysis: Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Active Ulcerative Colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(10):1702-1709. DOI: 10.1097/MIB.0000000000001228.
- [2] Sun C, Zhao Y, Gao X, et al. Cideb Deficiency Aggravates Dextran Sulfate Sodium-induced Ulcerative Colitis in Mice by Exacerbating the Oxidative Burden in Colonic Mucosa[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(8):1338-1347. DOI: 10.1097/MIB.0000000000001196.
- [3] 谭玉娥,袁东红.双歧杆菌乳杆菌三联活菌片联合奥沙拉秦钠胶囊治疗溃疡性结肠炎疗效及对 IL-1 β 和 IL-10 表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(26):2898-2900. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2017.26.016.
- [4] Zhu L, Gao J, Huang K, et al. miR-34a screened by miRNA profiling negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway in Aflatoxin B1 induced hepatotoxicity[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:16732. DOI: 10.1038/srep16732.
- [5] 季青山,俞茜,孙思勤,等. miR-34a/SIRT1 在 H₂O₂ 诱导人晶状体上皮细胞氧化应激中的表达[J]. *眼科新进展*, 2017, 37(8):728-731. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0184.
- [6] 杨强. Fas/FasL、p38 MAPK 通路在溃疡性结肠炎大鼠中的表达及雷公藤多苷的作用[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(2):218-223. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2019.02.015.
- [7] 陈海燕,姚永刚,邹传鑫,等.奥沙拉秦钠胶囊治疗溃疡性结肠炎 31 例[J]. *长江大学学报(自科版)医学卷*, 2009, 6(1):34-35. DOI:10.3969/j.issn.1673-1409(R).2009.01.013.
- [8] Wang Y, Liu L, Guo Y, et al. Effects of indigo naturalis on colonic mucosal injuries and inflammation in rats with dextran sodium sulphate induced ulcerative colitis[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2):1327-1336. DOI: 10.3892/etm.2017.4701.
- [9] 孔鹏飞,赵兵,覃勤,等.葡聚糖硫酸钠致大鼠急性溃疡性结肠炎模型建立与评价[J]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2015, 4(6):617-619. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2015.06.09.
- [10] Robles AI, Traverso G, Zhang M, et al. Whole-exome Sequencing analyses of Inflammatory Bowel Disease-associated Colorectal Cancers [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4):931-943. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.12.036.
- [11] 曾国明.奥沙拉秦钠胶囊和柳氮磺胺吡啶片在治疗溃疡性结肠炎中的临床治疗效果观察[J]. *中国伤残医学*, 2014, 22(14):169-171. DOI: 10.13214/j.cnki.cjotadm.2014.14.139.
- [12] 石晶波.奥沙拉秦钠胶囊和柳氮磺胺吡啶片在治疗溃疡性结肠炎中的疗效比较[J]. *吉林医学*, 2012, 33(18):3907. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0412.2012.18.083.
- [13] Long YJ, Liu XP, Chen SS, et al. miR-34a is involved in CSE-induced apoptosis of human pulmonary microvascular endothelial cells by targeting Notch-1 receptor protein[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1):21-27. DOI: 10.1186/s12931-018-0722-2.
- [14] Cao M, Chenchen P, Yue Y, et al. Nampt Expression Decreases Age-Related Senescence in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Targeting Sirt1[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0170930. DOI: 10.1371/journal.pone.0170930.
- [15] 季青山,俞茜,孙思勤,等. miR-34a/SIRT1 表达水平与小鼠白内障发生的相关性研究[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2017, 11(13):1982-1986. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2017.13.005.
- [16] Sun W, Cai Y, Zhang XX, et al. Osthole pretreatment alleviates TNBS-induced colitis in mice via both cAMP/PKA-dependent and independent pathways[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(8):1120-1128. DOI: 10.1038/aps.2017.71.
- [17] Gopu B, Dileep R, Rani MU, et al. Protective Role of Curcumin and Flunixin Against Acetic Acid-Induced Inflammatory Bowel Disease via Modulating Inflammatory Mediators and Cytokine Profile in Rats[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2015, 34(4):309-320. DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2015013049.
- [18] 周承志,姜楠,周从辉,等.复方苦参汤对溃疡性结肠炎模型大鼠的干预及作用机制研究[J]. *中国药师*, 2016, 19(10):1816-1820. DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2016.10.003.
- [19] 沈雁,钟继红,徐磊,等.盐酸小檗碱对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 表达的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(8):1094-1098. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.08.005.
- [20] 孙春霞,霍永利,郭喜军,等.化浊解毒愈溃方对溃疡性结肠炎大鼠黏膜损伤的修复作用[J]. *中国药房*, 2017, 28(10):1329-1332. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.09.

(收稿日期:2019-07-12)

(本文编辑:俞骏文)