

网络出版时间: 2020-8-21 15:26 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200820.1449.010.html

## 基于 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨托里消毒散 治疗放射性直肠炎的作用机制

祝朝富<sup>1</sup> 安佰平<sup>1</sup> 黄洪婕<sup>1</sup> 杜 驰<sup>2</sup> 吴勇俊<sup>1</sup> 蓝 兰<sup>3</sup> 李 丹<sup>4</sup> 雷冬梅<sup>5</sup> 李世杰<sup>1</sup> 敖 睿<sup>6</sup>

**摘要** 目的 基于 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨托里消毒散治疗放射性直肠炎的作用机制。方法 48 只 SD 大鼠随机分为 6 组 除空白组外 其余各组均诱导造放射性直肠炎大鼠模型 造模成功后大鼠正常喂养 3 d 后开始灌肠 空白组、模型组以 2 ml 的 0.9% 生理盐水灌肠 阳性对照组以蒙脱石散(0.2 g/ml) 联合地塞米松(1 mg/ml) 2 ml 灌肠 托里消毒散低(1 g/ml)、中(2 g/ml)、高剂量(4 g/ml) 分别 2 ml 灌肠, 每天 1 次 连续 10 d。处死大鼠 测直肠直径 采用 HE 染色考察直肠组织病理学变化; ELISA 检测血清干扰素- $\gamma$

(IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-4(IL-4)、IL-10、表皮生长因子(EGF) 水平及血清免疫球蛋白 IgA、IgM、IgG 含量; Western blot 检测直肠 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  表达; qRT-PCR 检测直肠 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、IL-6、IL-10 mRNA 表达。结果 托里消毒散高剂量可改善直肠组织病理变化 降低直肠炎症评分( $P < 0.05$ ); 托里消毒散高剂量较模型组可升高大鼠血清中 EGF、IL-4、IL-10、IgA、IgM、IgG 水平( $P < 0.05$ ) 降低大鼠直肠组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  表达及 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、IL-6 mRNA 表达( $P < 0.01$ )。结论 托里消毒散高剂量可改善放射性直肠炎大鼠的直肠组织病理学改变 对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关因子及炎性细胞因子的表达均具有一定作用。

**关键词** 大鼠; 放射性直肠炎; 托里消毒散; 信号通路  
中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1367-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.010

2020-03-27 接收

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(编号: 2017SZ0071)

作者单位: <sup>1</sup> 成都中医药大学附属医院 成都 610051<sup>2</sup> 内江市第二人民医院 内江 641100<sup>3</sup> 金堂县中医医院 成都 610400<sup>4</sup> 资阳市中医医院 资阳 641300<sup>5</sup> 成都市第五人民医院 成都 611130<sup>6</sup> 四川省人民医院 成都 610072

作者简介: 祝朝富, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: an-baiping67890@126.com

放射性直肠炎(radiation-induced proctitis, RIP)

level of PBLD in the GC and para-carcinoma normal tissues. **Methods** Collected 220 GC tumor tissues and 79 para-carcinoma normal gastric tissues. Recorded the clinic information. Used immunohistochemistry method to detect expression level of PBLD in the tissues. Analyzed the correlation of PBLD and clinic characteristics include the age, gender, tumor stage and migration. Constructed the plasmids for interference of the PBLD expression. Then, used the plasmids to down regulate the expression of PBLD in AGS cells. The cells transfected with empty plasmids were used as the control. Detected the interference efficiency by RT-PCR. Detected the cell proliferation ability by CCK-8 method and migration ability by Transwell assay. Detected the rate of apoptosis using Annexin V-PI and Flow cytometry. **Results** The positive rate of PBLD in GC tissues was 27.7%. It was lower than that in para-carcinoma normal tissues(63.3%) ( $P < 0.001$ ). The expression of PBLD was related with TNM stage( $P = 0.001$ ), lymphatic metastasis( $P = 0.016$ ) and differentiation( $P = 0.001$ ). After interference expression of PBLD, the proliferation ability of AGS cells was increased( $P < 0.01$ ). In Transwell assay, the cells that transfer to the basilar membrane in test group were more than those of control group. So the migration ability after interference expression of PBLD was promoted( $P < 0.05$ ). The total apoptosis rate of interference group was  $(7.36 \pm 0.78)\%$ , which was lower than that of control group( $11.76 \pm 0.64\%$ ) ( $P = 0.007$ ). The late apoptosis rate( $5.56 \pm 1.7\%$ ) of interference group was also lower than that of control group( $10.75 \pm 1.02\%$ ) ( $P = 0.015$ ). But the early apoptosis rate had no statistical significance. **Conclusion** PBLD has lower expression level in GC tissues. The down regulation of PBLD is related with the proliferation, migration and late apoptosis rate of GC cells. PBLD is a candidate cancer suppressor gene for GC.

**Key words** gastric cancer; PBLD; proliferation; migration; apoptosis

是接受放射治疗患者最常见的临床问题<sup>[1]</sup>。放射治疗后肠道功能障碍的人数持续增加,报道<sup>[2]</sup>显示接受前列腺癌放射治疗的患者中有 75% 以上发生急性 RIP。目前对 RIP 的治疗是反应性的,通常只在 RIP 发作后才给药。治疗方法如硫酸铝、5-氨基水杨酸等经常不能显著改善患者的生活质量,甚至在极少数情况下被证明会加重疾病。在利用外科干预如激光消融、电灼、硬化注射等方面,都具有发病率和死亡率的重大风险<sup>[3]</sup>。因此,需要一种非侵入性预防性治疗,以防止 RIP 的发生或将症状改善到不会影响患者生活质量的水平。中医药在治疗放射性直肠损伤中的作用更加突出,在预防和治疗方面更能体现其不可比拟的优越性<sup>[4]</sup>。因此,该研究考察托里消毒散对放射性直肠炎的作用效果及机制,为放射性直肠炎的治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物与分组** 成年雌性 SD 大鼠 48 只,体重(210 ± 10) g,购于成都达硕实验动物有限公司,使用许可证号:SYXK(川)2014-189。饲养于恒温(20 ~ 25 ℃)、恒湿(50% ± 5%)环境中,自然采光,自由饮水,饲以条杆状动物饲料。大鼠适应性饲养 3 d 后随机分为 6 组:空白组(未放疗 + 生理盐水)、模型组(放疗 + 生理盐水)、蒙脱石散联合地塞米松组(放疗 + 蒙脱石散 + 地塞米松)、托里消毒散低剂量组(放疗 + 托里消毒散低剂量)、托里消毒散中剂量组(放疗 + 托里消毒散中剂量)、托里消毒散高剂量组(放疗 + 托里消毒散高剂量),每组 8 只,本研究选择在大鼠放疗前 12 h 禁食。

**1.1.2 试剂** 地塞米松(国药准字 H41021255)购自天津药业集团;蒙脱石散(国药准字 H20000690)购自博福-益普生天津制药有限公司;干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) (货号: ZC-36294)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) (货号: ZC-37624)、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) (货号: ZC-36402)、IL-10 (货号: ZC-36379)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (货号: ZC-36425)、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) (货号: ZC-37000)、IgM (货号: ZC-37006)、IgG (货号: ZC-37002) 试剂盒购自上海茁彩生物科技有限公司;TRIzol 试剂 RNA 提取试剂盒(批号: 14105) 购自美国 Invitrogen 公司;PCR 扩增试剂盒(批号: AK9906) 购自日本 TaKaRa 公司;TLR4 (货号: ab217274)、

Myd88(货号: ab2064)、I $\kappa$ B $\alpha$  (货号: ab7217) 相关抗体购自英国 Abcam 公司;NF- $\kappa$ B p65(批号: 10745-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司; $\beta$ -actin (批号: MABT825) 购自德国 Merckmillipore 公司;蛋白定量试剂盒(BCA 法) 购自美国 R&D 公司。

**1.2 大鼠放射性直肠炎模型构建** 参照文献<sup>[5]</sup> 采用盆腔局部单次大剂量照射的方法建立放射性直肠炎大鼠动物模型。除空白组外的其余大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠(50 mg/kg) 麻醉。待大鼠肌浅反射消失,完全松弛后,以仰卧体位固定在自制塑料板上,以 6MV-X 线直线加速器照射。照射范围自耻骨联合至肛门,放射野面积 30 cm × 20 cm,两侧放空,放疗区覆盖 0.5 cm 厚补偿膜,源皮距 100 cm,开机剂量 1 600 mu。照射完毕,等待动物全部苏醒后,送返实验中心继续饲养。空白组小鼠置于相似环境中,但不予照射。以造模后大鼠出现稀便、黏液便或柏油样便判定造模成功。

**1.3 药物的制备** 托里消毒散:生晒参 15 g、黄芪 30 g、当归 15 g、川芎 15 g、白芍 15 g、炒白术 15 g、茯苓 30 g、白芷 15 g、皂角刺 15 g、金银花 15 g、炙甘草 6 g。方剂来源明代陈实功所著《外科正宗》<sup>[6]</sup>,所有中药均由成都中医药大学附属医院中药房统一采供招标,所有中药均符合国家药典要求。因采用灌肠方式,遂将散剂制备成浓缩汤剂,按组方称取药材,先加 372 ml 蒸馏水,浸泡 30 min,后使用砂锅将其大火煮开,进行第一次煎煮,大火 10 min,后小火煮 50 min,冷却,过滤,留取滤液;再将煎煮过的药渣放入砂锅,加入 930 ml 蒸馏水,进行第二次煎煮,大火煮开,持续 10 min,后小火煮 50 min,冷却,过滤,留取滤液;将第一次煎的滤液和第二次煎的滤液合并放入烧杯,小火加热,进行浓缩,浓缩至 93 ml,即含生药 2 g/ml 溶液。同理,制备含生药 1 g/ml 和 4 g/ml 溶液。冷却,装入密封袋中,4 ℃ 冷藏备用。地塞米松(天津药业集团,国药准字 H41021255) 加入蒸馏水稀释至 1 mg/ml,蒙脱石散(博福-益普生天津制药有限公司,国药准字 H20000690) 加入蒸馏水溶解为 0.2 g/ml。

**1.4 给药方法** 造模成功后大鼠正常喂养 3 d 后,开始灌肠,每天灌肠 1 次,连续 10 d。空白组、模型组:生理盐水(0.9% NS) 2 ml 灌肠;蒙脱石散联合地塞米松组:蒙脱石散(0.2 g/ml) 联合地塞米松(1 mg/ml) 2 ml 灌肠;托里消毒散低剂量组:托里消毒散低剂量(含生药 1 g/ml) 2 ml 灌肠;托里消毒散中剂量组:托里消毒散中剂量(含生药 2 g/ml) 2 ml 灌

肠; 托里消毒散高剂量组: 托里消毒散高剂量(含生药 4 g/ml) 2 ml 灌肠。

**1.5 样本采集** 血样采集: 尾静脉抽取 4 ml 3 000 r/min 低温离心 15 min, 分离血清, -80 °C 冰箱保存。直肠组织采集: 处死所有大鼠, 离断大鼠直肠, 将直肠分为 2 部分, 距肛门 2 cm ~ 1 cm 段直肠浸泡于 4% 的多聚甲醛液体, 用于做 HE 染色检查。距肛门 1 cm 以下段直肠放入 DEPC 处理过的 1.5 ml EP 管中, 冻存于 -80 °C 冰箱, 留待做炎症因子的 Western blot 及 qRT-PCR 检测。

## 1.6 观察指标

**1.6.1 体质量变化** 给药开始后所有大鼠每隔 2 d 测体质量 1 次, 观察体质量变化。

**1.6.2 大鼠直肠直径的检测** 大鼠处死后以游标卡尺检测大鼠距肛门 1 cm 以上大鼠的直肠直径。

**1.6.3 组织病理学观察** 将固定的直肠组织按常规方法制备石蜡切片, HE 染色, 镜检观察。采用打分法记分放射性直肠炎腺体减少, 以大鼠直肠黏膜腺体减少的程度作为评判炎症严重程度的指标: 腺体正常为 0 分, 腺体减少 < 25% 为 1 分, 腺体减少  $\geq$  25% ~ 50% 为 2 分, 腺体减少  $\geq$  50% ~ 75% 为 3 分, 腺体减少 > 75% 为 4 分。

**1.6.4 ELISA 检测血清因子** 按照试剂盒说明操作, 采用 ELISA 试剂盒(上海茁彩)检测血清 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10、EGF 水平, 检测血清免疫球蛋白 IgA、IgM、IgG 水平。

**1.6.5 Western blot 检测** 用 RIPA 裂解液从直肠组织中提取总蛋白, 以 BCA 法进行蛋白质定量, 并用蛋白上样缓冲液(5 $\times$ )变性样品, 样品于 -20 °C 保存备用。使用等量蛋白质上样, 选择 10% 的 SDS-PAGE 进行分离, 分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 封闭结束后按照实验目的结合一抗 TLR4、Myd88、I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65、 $\beta$ -actin 均按 1 : 500 稀释, 4 °C 孵育过夜后 TBST 清洗,

然后根据一抗来源选择合适的二抗(1 : 5 000), 室温孵育 1 h, TBST 清洗, ECL 暗室显色。显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像, Image-ProPlus 分析光密度, 以  $\beta$ -actin 为内参, 阴性对照组目标蛋白质相对含量为 1, 计算各组蛋白质的相对表达量, 实验重复 3 次。

**1.6.6 qRT-PCR 检测** qRT-PCR 检测各组直肠组织中 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ Bp65、IL-6、IL-10 mRNA 表达, 采用 RNA 提取试剂盒提取直肠组织总 RNA, 测定 A260 和 A280 吸光度值, 电泳确定 RNA 的完整性后, 依据 mRNA 反转录试剂盒说明, 合成 cDNA, 采用 SYBR Green I real-time PCR 的方法检测 mRNA 的相对表达量, U6 作为内参。PCR 循环条件为 95 °C、30 s; 95 °C、5 s; 60 °C、30 s; 40 个循环。记录 Ct 值, 并采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析直肠组织 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ Bp65、IL-6、IL-10 mRNA 相对表达水平。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件分析, 试验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据统计采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠体质量变化** 模型组第 1、5、7、10 天的体质量均低于空白组 ( $P < 0.01$ ), 与模型组相比, 托里消毒散中、高剂量组大鼠体质量明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 大鼠直肠变化

**2.2.1 大鼠直肠病理组织观察** 与空白组比较, 模型组直肠组织结构出现不同程度病变, 黏膜被覆上皮不同程度变性、脱落、坏死, 血管扩张充血、出血, 黏膜下层内大量炎性细胞浸润。与模型组比较, 蒙脱石散 + 地塞米松组直肠组织结构较模糊, 正常肠腺减少, 黏膜下层及肌层细胞坏死, 血管充血扩张, 伴有轻度出血。托里消毒散低剂量组黏膜上皮缺失, 固有层内部分肠腺坏死, 结构模糊, 间质内毛细

表 1 大鼠体质量变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	第 1 天	第 5 天	第 7 天	第 10 天
空白	192.77 $\pm$ 1.42	196.23 $\pm$ 1.02	198.03 $\pm$ 1.36	202.23 $\pm$ 1.18
模型	182.00 $\pm$ 0.61 <sup>##</sup>	185.33 $\pm$ 0.78 <sup>##</sup>	187.00 $\pm$ 1.67 <sup>##</sup>	190.10 $\pm$ 1.67 <sup>##</sup>
蒙脱石散 + 地塞米松	186.50 $\pm$ 1.25 <sup>**</sup>	190.20 $\pm$ 1.30 <sup>**</sup>	191.53 $\pm$ 1.15 <sup>**</sup>	193.33 $\pm$ 1.07 <sup>*</sup>
托里消毒散低剂量	185.20 $\pm$ 1.25 <sup>*</sup>	188.43 $\pm$ 1.16 <sup>*</sup>	190.07 $\pm$ 1.55 <sup>*</sup>	192.50 $\pm$ 1.35 <sup>*</sup>
托里消毒散中剂量	188.03 $\pm$ 2.25 <sup>**</sup>	190.83 $\pm$ 1.65 <sup>**</sup>	191.60 $\pm$ 1.35 <sup>**</sup>	194.43 $\pm$ 1.17 <sup>**</sup>
托里消毒散高剂量	189.63 $\pm$ 1.15 <sup>**</sup>	192.07 $\pm$ 1.46 <sup>**</sup>	193.20 $\pm$ 1.35 <sup>**</sup>	195.87 $\pm$ 1.40 <sup>**</sup>
F 值	20.818	25.073	20.071	29.518
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

与空白组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

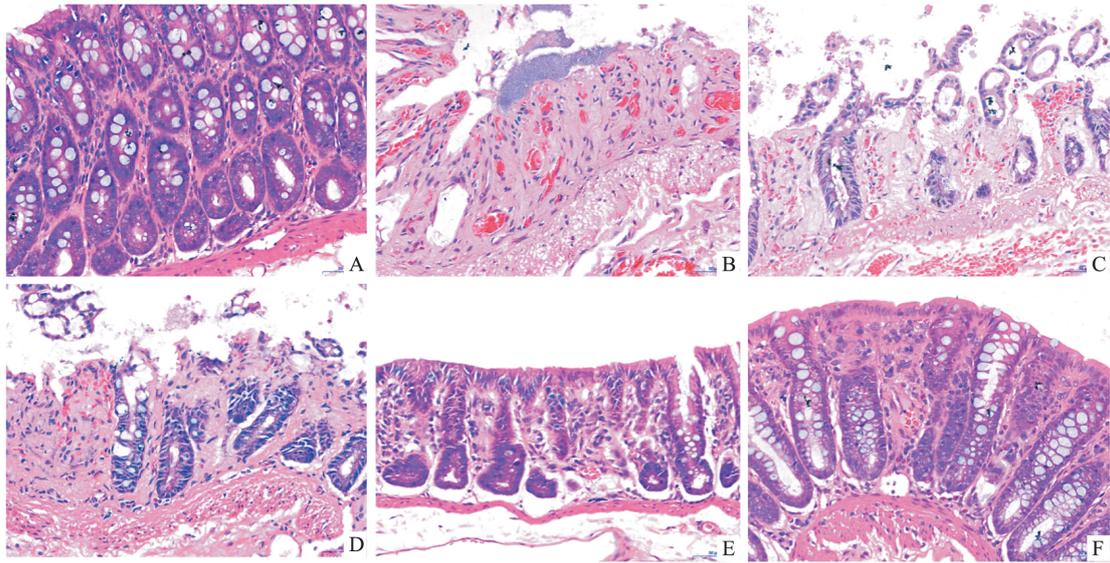


图1 大鼠直肠组织 HE 染色 ×400

A: 空白组; B: 模型组; C: 蒙脱石散 + 地塞米松组; D: 托里消毒散低剂量组; E: 托里消毒散中剂量组; F: 托里消毒散高剂量组

血管轻微充血。托里消毒散中剂量组直肠组织结构较完整,黏膜表面被覆单层柱状上皮,固有层内肠腺结构基本正常,排列较稀疏。托里消毒散高剂量组直肠组织结构较完整,固有层内大肠腺排列较为密集,杯状细胞数量正常,间质内少量嗜酸性粒细胞浸润,未见其他明显病理改变。染色结果见图1。

2.2.2 大鼠直肠组织病理炎症评分及直肠直径变化 与空白组相比,模型组直肠炎症评分、直肠直径升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,托里消毒散中、高剂量组可降低直肠炎症评分及直肠直径( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 放射性直肠炎炎症评分及直肠直径统计结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	直肠炎症评分	直肠直径(mm)
空白	0.00 ± 0.00	2.67 ± 0.12
模型	3.75 ± 0.46 <sup>##</sup>	4.03 ± 0.21 <sup>##</sup>
蒙脱石散 + 地塞米松	3.25 ± 0.71	3.77 ± 0.15*
托里消毒散低剂量	3.13 ± 0.83*	3.90 ± 0.10
托里消毒散中剂量	2.38 ± 0.52 <sup>**</sup>	3.77 ± 0.12*
托里消毒散高剂量	1.25 ± 0.71 <sup>**</sup>	3.70 ± 0.10*
F 值	44.433	38.288
P 值	<0.001	<0.001

与空白组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

2.3 大鼠血清 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10、EGF 水平 与空白组比较,模型组 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  水平升高,IL-4、IL-10、EGF 水平降低( $P < 0.01$ );经不同处理干预,与模型组比较,托里消毒散高剂量组大鼠血清 EGF、IL-4、IL-10 水平升高,托里消毒散高剂量组大鼠血清 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.01$ )。见表3。

2.4 大鼠血清免疫球蛋白 IgA、IgM、IgG 含量 与空白组比较,模型组大鼠血清 IgA、IgM、IgG 水平降低( $P < 0.01$ );经不同处理干预,与模型组比较,托里消毒散高剂量组大鼠血清 IgA、IgM、IgG 水平升高( $P < 0.05$ )。见表4。

2.5 大鼠直肠组织 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  表达 Western blot 结果显示,模型组较空白组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达均升高( $P < 0.01$ ),经不同处理组干预治疗,托里消毒散中、高剂量组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达较模型组均降低( $P < 0.01$ )。见图2。

2.6 大鼠直肠组织 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、IL-6、IL-10 mRNA 表达 qRT-PCR 结果显示,模型组较空白组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、IL-6 mRNA 表达升高,IL-10 mRNA 表达降低( $P < 0.01$ );经不同处理组干预治疗,仅托里消毒散高剂量组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ Bp65、IL-6 mRNA 表达较模型组均降低,IL-10 mRNA 表达升高( $P < 0.01$ )。见表5。

### 3 讨论

RIP 极大地降低了接受前列腺癌、子宫颈癌、直肠癌或膀胱癌放射治疗患者的生活质量,目前的治疗往往不能减轻与 RIP 相关的疼痛和不适。中药副作用及刺激性较小,可集中治疗放射损伤和炎症后的 RIP,保护胃肠道,将显著提高患者的生活质量<sup>[7]</sup>。

淋巴细胞是受照射组织在急性期和慢性期白细

表3 大鼠血清 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10、EGF 水平( $\bar{x} \pm s$   $n=8$ )

组别	TNF- $\alpha$ ( pg/ml)	IL-10( pg/ml)	EGF( pg/ml)	IFN- $\gamma$ ( pg/ml)	IL-4( pg/ml)
空白	41.250 $\pm$ 0.464	6.687 $\pm$ 0.208	69.250 $\pm$ 2.418	172.520 $\pm$ 5.365	19.470 $\pm$ 0.658
模型	47.593 $\pm$ 1.052 <sup>##</sup>	5.573 $\pm$ 0.172 <sup>##</sup>	57.270 $\pm$ 4.516 <sup>##</sup>	197.977 $\pm$ 4.054 <sup>##</sup>	17.813 $\pm$ 0.450 <sup>##</sup>
蒙脱石散 + 地塞米松	45.810 $\pm$ 0.671	5.790 $\pm$ 0.211	62.850 $\pm$ 3.331	187.020 $\pm$ 2.456 <sup>*</sup>	18.240 $\pm$ 0.552
托里消毒散低剂量	45.963 $\pm$ 1.299	5.813 $\pm$ 0.276	62.753 $\pm$ 3.855	186.450 $\pm$ 6.877 <sup>*</sup>	18.033 $\pm$ 0.786
托里消毒散中剂量	44.913 $\pm$ 1.885 <sup>*</sup>	6.020 $\pm$ 0.212 <sup>*</sup>	64.523 $\pm$ 4.738 <sup>*</sup>	183.497 $\pm$ 8.722 <sup>*</sup>	18.447 $\pm$ 0.387
托里消毒散高剂量	43.393 $\pm$ 0.845 <sup>**</sup>	6.320 $\pm$ 0.173 <sup>**</sup>	66.693 $\pm$ 2.912 <sup>**</sup>	177.917 $\pm$ 5.898 <sup>**</sup>	19.143 $\pm$ 0.423 <sup>*</sup>
F 值	11.538	11.099	3.603	6.519	4.025
P 值	<0.001	<0.001	0.032	0.004	0.022

与空白组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

表4 大鼠血清免疫球蛋白 IgA、IgM、IgG 含量( $\bar{x} \pm s$   $n=8$ )

组别	IgA( $\mu$ g/ml)	IgM( $\mu$ g/ml)	IgG( pg/ml)
空白	44.93 $\pm$ 0.98	203.96 $\pm$ 4.57	1.67 $\pm$ 0.05
模型	41.45 $\pm$ 0.77 <sup>##</sup>	186.71 $\pm$ 4.09 <sup>##</sup>	1.53 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>
蒙脱石散 + 地塞米松	42.78 $\pm$ 1.05	188.27 $\pm$ 4.35	1.56 $\pm$ 0.06
托里消毒散低剂量	42.68 $\pm$ 1.10	190.91 $\pm$ 9.24	1.58 $\pm$ 0.02
托里消毒散中剂量	43.27 $\pm$ 1.78	194.27 $\pm$ 8.08	1.63 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>
托里消毒散高剂量	44.43 $\pm$ 1.45 <sup>*</sup>	198.44 $\pm$ 4.71 <sup>*</sup>	1.67 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>
F 值	3.154	3.362	3.543
P 值	0.048	0.040	0.034

与空白组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

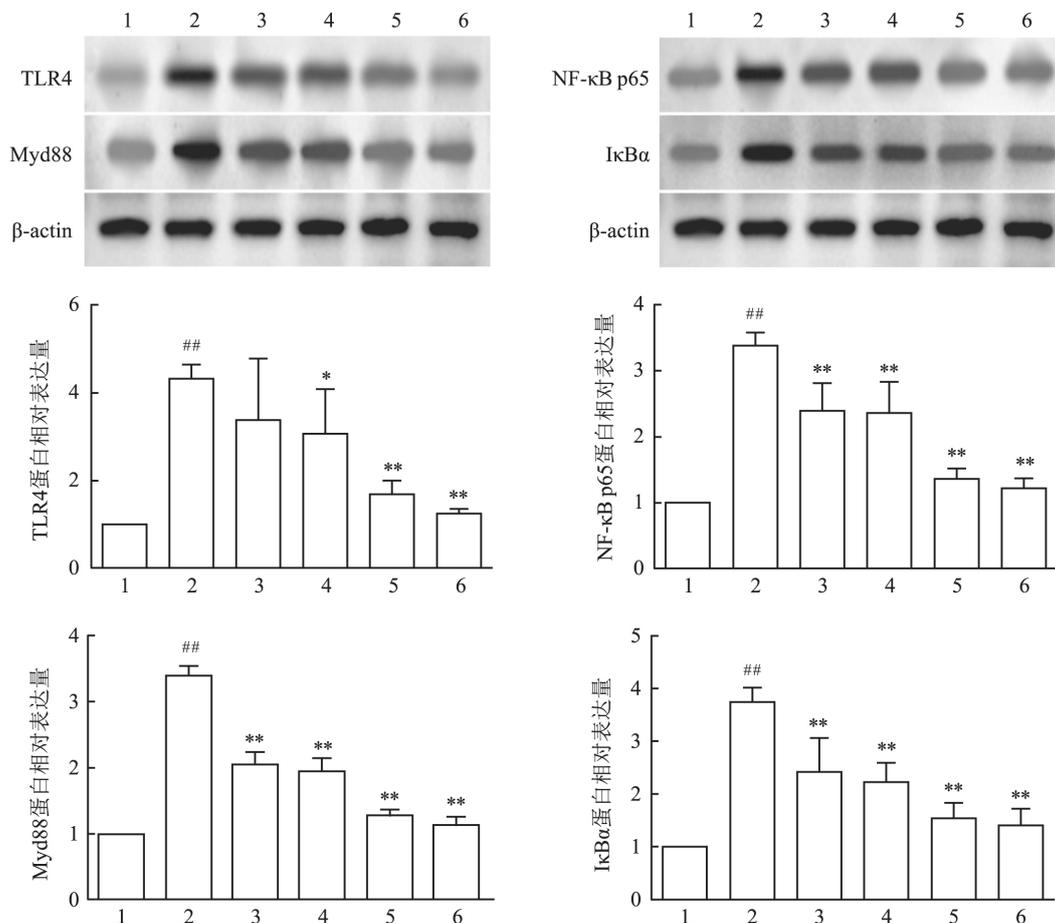


图2 大鼠直肠组织 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达

1: 空白组; 2: 模型组; 3: 蒙脱石散 + 地塞米松组; 4: 托里消毒散低剂量组; 5: 托里消毒散中剂量组; 6: 托里消毒散高剂量组; 与空白组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

表5 大鼠直肠组织 TLR4、Myd88、NF-κB p65、IL-6、IL-10 mRNA 表达( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	TLR4	Myd88	NF-κB p65	IL-6	IL-10
空白	1.003 ± 0.072	1.000 ± 0.076	1.003 ± 0.072	1.003 ± 0.076	1.000 ± 0.036
模型	2.577 ± 0.435 <sup>##</sup>	3.897 ± 0.784 <sup>##</sup>	1.703 ± 0.330 <sup>##</sup>	1.727 ± 0.047 <sup>##</sup>	0.327 ± 0.075 <sup>##</sup>
蒙脱石散 + 地塞米松	1.907 ± 0.439	2.247 ± 0.731 <sup>* *</sup>	1.343 ± 0.114 <sup>*</sup>	1.623 ± 0.059	0.473 ± 0.125
托里消毒散低剂量	1.867 ± 0.792	2.443 ± 0.924 <sup>*</sup>	1.663 ± 0.178	1.580 ± 0.020 <sup>*</sup>	0.437 ± 0.078
托里消毒散中剂量	1.343 ± 0.366 <sup>* *</sup>	1.437 ± 0.541 <sup>* *</sup>	1.357 ± 0.157 <sup>*</sup>	1.343 ± 0.096 <sup>* *</sup>	0.583 ± 0.159 <sup>* *</sup>
托里消毒散高剂量	1.217 ± 0.335 <sup>* *</sup>	1.203 ± 0.320 <sup>* *</sup>	1.183 ± 0.064 <sup>* *</sup>	1.233 ± 0.021 <sup>* *</sup>	0.843 ± 0.076 <sup>* *</sup>
F 值	4.733	8.688	7.061	62.939	20.322
P 值	0.012	0.001	0.003	<0.001	<0.001

与空白组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\* \*</sup> $P < 0.01$

胞侵袭的常见成分。已有研究表明结肠中可见的活化 T 细胞的持续浸润与黏膜损伤相关, T 细胞能够分化为不同的效应 T 细胞亚群(Th1/Th2/Th17 和 Treg), Th1/Th2 亚群的免疫失衡已被证明在许多炎症性肠道疾病中起决定性作用, 并可能参与放射性损伤的慢性化。然而, 几乎没有可用于表征局部照射后 T 细胞亚群的数据<sup>[8]</sup>。已经证明定位于结肠直肠的分次照射诱导 Th2 特异性转录因子的表达。此外, 在缺乏 Th1 的环境中进行肠道照射会加速纤维化过程的发生<sup>[9]</sup>。同时, 研究<sup>[10]</sup>显示 Th1 细胞主要产生的促炎因子 IFN- $\gamma$  能够调节肠上皮细胞表面受体功能, 抑制 Th2 细胞的增殖, 引起组织损伤; 而 Th2 细胞主要分泌的抑炎因子 IL-4 和 IL-10, 可抑制 Th1 细胞的增殖, 使炎症局限化, 因此, Th1/Th2 的平衡是调控细胞免疫和体液免疫之间的平衡的关键。EGF 可促进细胞生长及对表皮细胞和成纤维细胞趋化作用, 使其迁移到受损部位, 在创面愈合过程中起着重要的作用。免疫球蛋白 IgG、IgM 在机体出现炎症及损伤时是介导体液免疫反应的主要因子, 在机体抵抗疾病的过程中发挥着至关重要的功能, 其含量的高低是衡量机体防御功能的重要指标<sup>[11]</sup>。因此, IgA、IgM、IgG 含量的检测可以作为判断病情的有力证据。本实验结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IgA、IgM、IgG 含量增加, 而 IL-4、IL-10、EGF 含量呈降低( $P < 0.01$ ); 干预治疗后, 仅托里消毒散高剂量组 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IgA、IgM、IgG 含量降低, IL-4、IL-10、EGF 含量增加( $P < 0.05$ )。表明托里消毒散高剂量可使 Th1/Th2 平衡向 Th1 方向移动, 并影响免疫球蛋白表达从而影响炎症损伤。

TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路与炎症反应密切相关。TLR4 在天然免疫中识别病原微生物和控制获得性免疫反应中起着重要的作用, TLR4 被激活后衔接蛋白 MyD88 进行信号传导, 促使一些细胞因子产生,

加重肠道炎症<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>证实 TLR4 基因缺陷小鼠的结肠固有层中有少量的炎症浸润, 而未敲除 TLR4 基因的小鼠则有严重的肠道炎症, 当细胞质中的 TLR4 结构域与 MyD88 羧基端结合引起 MyD88 大量募集下游蛋白后, NF- $\kappa$ B 炎症通路被激活, NF- $\kappa$ B 的激活是肠道炎中炎症反应激活和增殖的关键步骤。此外, 大量临床研究也表明应用 NF- $\kappa$ B p65 寡核苷酸可明显降低黏膜中 NF- $\kappa$ B p65 和细胞因子的表达, 改善临床症状的严重程度, 因此, NF- $\kappa$ B 在炎症发展中起着关键性的作用。激活 NF- $\kappa$ B 信号通路会促进大量的炎症介质如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等表达, 而这些炎症介质又进一步活化 NF- $\kappa$ B, 形成一个正反馈循环, 使炎症反应不断放大, 加重肠道炎症反应和黏膜的损伤<sup>[14]</sup>。IL-6 是由各种细胞产生的促炎细胞因子并发挥多效性作用<sup>[15]</sup>。本试验结果显示, 模型组较空白组有大量的 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、IL-6 表达, 给予托里消毒散治疗后, 托里消毒散中、高剂量组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B p65、IL-6 表达降低( $P < 0.05$ )。表明托里消毒散可减轻局部炎症反应表现, 通过抑制 NF- $\kappa$ B 的激活, 进一步降低炎症介质 IL-6 的表达。

综上, 托里消毒散随剂量增加可改善放射性直肠炎大鼠的直肠组织病理学改变, 对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关因子及炎症细胞因子的表达均具有一定作用, 表明托里消毒散对放射性直肠炎的作用机制可能与 TLR4/NF- $\kappa$ B 有关。

### 参考文献

- [1] Ashburn J H, Kalady M F. Radiation-induced problems in colorectal surgery[J]. Clin Colon Rectal Surg, 2016, 29(2): 85-91.
- [2] Ma S, Zhang T, Jiang L, et al. Impact of bladder volume on treatment planning and clinical outcomes of radiotherapy for patients with cervical cancer[J]. Cancer Manag Res, 2019, 29(11): 7171-81.

- [3] Porouhan P, Farshchian N, Dayani M. Management of radiation-induced proctitis [J]. *J Family Med Prim Care*, 2019, 8(7): 2173.
- [4] 崔亚云, 张红雁, 张锋利, 等. 中药口服加灌肠治疗急性放射性直肠炎疗效观察 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(2): 183-6.
- [5] Kang S, Chun M, Jin Y M, et al. A rat model for radiation-induced proctitis [J]. *J Korean Med Sci*, 2000, 15(6): 682-9.
- [6] 闵丽, 张少军, 张辉, 等. 托里消毒散治疗正虚邪恋型体表瘰疬大鼠的实验研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(12): 1681-6.
- [7] Lenz L, Rohr R, Nakao F, et al. Chronic radiation proctopathy: A practical review of endoscopic treatment [J]. *World J Gastrointest Surg*, 2016, 8(2): 151.
- [8] Schae D, McBride W H. T lymphocytes and normal tissue responses to radiation [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 119.
- [9] Linard C, Billiard F, Benderitter M. Intestinal irradiation and fibrosis in a Th1-deficient environment [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 84(1): 266-73.
- [10] Bessout R, Demarquay C, Moussa L, et al. TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells [J]. *J Pathol*, 2015, 237(4): 435-46.
- [11] 陈鹏飞, 农海宁, 王伟, 等. 医用三氧橄榄油对大鼠放射性皮炎创面愈合及 EGF、bFGF 表达的影响 [J]. *临床合理用药杂志*, 2017, 10(31): 37-8.
- [12] 田亮, 薛洁, 刘丽丽, 等. 盐酸青藤碱对实验性结肠炎小鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. *中国药师*, 2018, 21(5): 797-801.
- [13] 简晓源, 刘杰民. TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路与溃疡性结肠炎 [J]. *胃肠病学*, 2013, 18(4): 244-6.
- [14] Dzhugashvili M, Luengo-Gil G, García T, et al. Role of genetic polymorphisms in NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory pathways in response to primary chemoradiation therapy for rectal cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 90(3): 595-602.
- [15] 杨立静, 吴超. 健脾解毒清肠方治疗急性直肠炎的临床疗效及对 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  及 IL-6 表达的影响 [J]. *中医药信息*, 2018(2): 91-4.

## Mechanism of modified Tuoli Xiaodu powder in the treatment of radiation proctitis based on TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway

Zhu Chaofu, An Baiping, Huang Hongjie, et al

(Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610051)

**Abstract Objective** To explore the mechanism of modified Tuoli Xiaodu powder in the treatment of radiation proctitis based on TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into 6 groups, except for the control group, all the other groups were induced to make the rat model of radiation proctitis. After 3 d of normal feeding, the rats began enema, the control group and model group were enema with 2 ml 0.9% normal saline, and the positive control group were treated with 2 ml montmorillonite powder (0.2 g/ml) combined with dexamethasone (1 mg/ml) enema, modified Tuoli Xiaodu powder 2 ml enema with low (1 mg/ml), medium (2 mg/ml) and high dose (4 mg/ml) was performed once a day for 10 d. Then rats were killed, the diameter of rectum was measured, the histopathological changes of rectum were observed by HE staining, the levels of serum interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-4 (IL-4), IL-10, epidermal growth factor (EGF) and IgA, IgM and IgG were measured by ELISA, the expressions of TLR4, Myd88, NF- $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B $\alpha$  in rectum were detected by Western blot, and the expressions of TLR4, Myd88, NF- $\kappa$ B p65, IL-6 and IL-10 mRNA in rectum were detected by qRT-PCR. **Results** High dose of modified Tuoli Xiaodu powder could significantly improve the pathological changes of rectal tissue and reduce the score of rectal inflammation ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the high dose of modified Tuoli Xiaodu powder could significantly increase the levels of serum EGF, IL-4, IL-10, IgA, IgM and IgG ( $P < 0.05$ ). The expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TLR4, Myd88, NF- $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B $\alpha$  and TLR4, Myd88, NF- $\kappa$ B p65 and IL-6 mRNA significantly decreased in rats ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The high dose of modified Tuoli Xiaodu powder can significantly improve the pathological changes of rectum in rats with radiation proctitis and play a significant role in the expression of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway related factors and inflammatory cytokines.

**Key words** rats; radiation proctitis; modified Tuoli Xiaodu powder; signaling pathway