

基础研究

白头翁汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道 miR-19a 表达的影响

周鹏志^{1,3}, 刘凤斌², 罗琦², 孙嫣¹, 丁飞跃¹, 陈斌²¹广州医学院第三附属医院消化科, 广东 广州 510150; ²广州中医药大学第一附属医院消化科, 广东 广州 510405; ³中山大学附属第一医院消化科, 广东 广州 510086

摘要:目的 通过观察疾病活动指数(DAI)、组织病理学变化,研究白头翁汤对小鼠实验性溃疡性结肠炎的治疗作用,并进一步研究 miR-19a 的表达,探讨其治疗作用的可能机制。方法 选取40只c57小鼠,随机等分为4组(10只/组):正常对照组、模型组(DSS)、治疗组(DSS+白头翁汤)和阳性对照组(DSS+5-ASA)。给予各模型组小鼠自由饮用3.5% DSS溶液以及相应药物灌胃,正常对照组自由饮用同等量的饮用水。每天观察并记录DAI评分,7 d后处死小鼠,取肠道炎症组织观察病理变化。RT-qPCR方法检测miR-19a表达变化。结果 模型组小鼠的DAI评分及病理学评分显著高于对照组。DSS+白头翁汤组的DAI评分及病理学评分显著低于DSS模型组,说明白头翁汤对于小鼠实验性溃疡性结肠炎有一定的疗效。模型组miR-19a的表达显著低于对照组,DSS+白头翁汤组miR-19a的表达显著高于DSS模型组,提示白头翁汤可以通过增加miR-19a的表达而起到减轻炎症的作用。结论 白头翁汤对于小鼠实验性溃疡性结肠炎有一定的疗效,可能通过增加miR-19a的表达而发挥作用。

关键词:白头翁汤;溃疡性结肠炎;miR-19a

中图分类号:R574.62 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)11-1597-03

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.11.015

Effect of Baitouweng Decoction on intestinal miR-19a expression in mice with ulcerative colitis

ZHOU Pengzhi^{1,3}, LIU Fengbin², LUO Qi², SUN Yan¹, DING Feiyue¹, CHEN Bin²¹Department of Gastroenterology, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China; ²Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ³Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Guangzhou Sun Yat-sen University, Guangzhou 510086 China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of Baitouweng Decoction on dextran sodium sulphate (DSS)-induced ulcerative colitis in mice and explore its mechanism involving miR-19a. **Methods** Forty female c57 mice were randomly allocated into 4 equal groups, namely the normal control group, model group (treated with 3.5% DSS solution), treatment group (treated with DSS+Baitouweng Decoction), and positive control group (treated with DSS+5-ASA). Ulcerative colitis was induced in the mice by feeding them with 3.5% DSS in drinking water, and the mice in the control group were given water only. The disease activity index (DAI) of the mice in each group was recorded daily. Seven days later, the mice were sacrificed for histological examination of the intestines using HE staining; the expression of miR-19a mRNA in the intestines was detected using RT-qPCR. **Results** Compared with the control group, the model group showed significantly increased DAI and histological scores, and administration of Baitouweng Decoction significantly lowered the DAI and histological scores of the DSS-treated mice. The expression of miR-19a was lowered following DSS treatment, and Baitouweng Decoction treatment caused an increased miR-19a expression in DSS-treated mice. **Conclusion** Baitouweng Decoction has therapeutic effects on DSS-induced ulcerative colitis in mice, and this effect is probably mediated by enhancement of miR-19a expression in the intestines.

Key words: Baitouweng Decoction; ulcerative colitis; miR-19a

临床实践证实,作为清热祛湿法的代表方剂——白头翁汤,对活动性溃疡性结肠炎的治疗起到了良好的疗效^[1-4],但其作用的分子机制,尚不得而知。近来有研究报道MicroRNA与溃疡性结肠炎的发病及炎症活动有关^[5-10],其中miR-19a在UC中表达明显下调^[11],提示

miR-19a可能是参与UC发病重要因子。本研究白头翁汤对UC小鼠结肠miR-19a表达的影响,进一步探讨其治疗溃疡性结肠炎的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性c57小鼠40只,6~8周龄,体质量17~20 g,购于中山大学实验动物中心。

1.2 主要试剂

1.2.1 葡聚糖硫酸钠(DSS,相对分子质量36 000~50 000; MP Biomedicals, USA):配成3.5% DSS溶液,用于造模。

收稿日期:2012-08-27

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81001506);广东省中医药局科研课题计划(20112157);广州中医药大学校级创新基金(10CX002)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81001506).

作者简介:周鹏志,在读博士研究生,副主任医师,E-mail: pzzhouzp@126.com

通讯作者:陈斌,博士,副主任医师,E-mail: ddwchen@yahoo.com.cn

1.2.2 白头翁汤(中药成分为白头翁 10 g,黄柏 15 g,黄连 15 g,秦皮 15 g):浓度 1.125 g/ml 剂量 0.0092 g/g(体质量),小鼠体质量约 20 g 即每日灌胃药量为 170 μ l。

1.2.3 5-氨基水杨酸(5-ASA):0.05 g/ml 剂量 0.0005 g/g(体质量),小鼠体质量约 20 g,即每日灌胃药量为 200 μ l。

1.2.4 miR-19a 的 qPCR 定量检测试剂:采用 QIAGEN miRNeasy Mini Kit (QIAGEN), TransScript II Reverse Transcriptase(Transgen), SsoFast™ EvaGreen® Super-mix (BIO-RAD)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模 根据文献造模,造模药物采用 3.5%葡聚糖硫酸钠(DSS),自由饮用 7~14 d,观察造模情况。

1.3.2 实验分组 40 只动物随机分成 4 组,每组 10 只。A 组:正常对照组,不作处理,自由饮水进食。B 组:DSS 组,每日自由饮用 3.5% DSS 替代自由饮水,每只饮用 3.5% DSS 5~7 ml/d,自由进食饲料。C 组:5-氨基水杨酸组,每日自由饮用 3.5% DSS 替代自由饮水,每只饮用 3.5% DSS 5~7 ml/d,自由进食饲料,以 5-氨基水杨酸(0.05g/ml)灌胃,剂量 200 μ l/d。D 组:白头翁汤剂组,每日以自由饮用 3.5% DSS 替代自由饮水,每只饮用 3.5% DSS 5~7 ml/d,自由进食饲料,每只每日以白头翁汤剂(1.125 g/ml)按 0.0092 g/g(体质量)灌胃 1 次(170 μ l/d)。

造模时间以模型组(B 组)为参考,造模至第 2 天,模型组开始有小鼠出现腹泻表现,症状持续,逐渐加重,伴有出血,无缓解趋势;造模第 7 天,模型组开始有小鼠出现死亡,剩余小鼠活力下降,终止造模。

1.3.3 疾病活动指数(DAI)评分 采用 murano 等的 DAI 评分标准每日对实验动物进行 DAI 评分^[8]。

1.3.4 观察结肠组织病理变化 采用颈椎脱臼法处死对照组及实验组小鼠,开腹取其结肠部位。将石蜡包埋的结肠组织标本连续进行切片,切成 3.5 μ m 厚的切片,常规苏木精伊红染色(HE)后,二甲苯透明,并用中心树脂封片,在显微镜下观察结肠组织学改变情况。

1.3.5 miRNA 的检测 取正常及模型小鼠结肠部分,依照 miRNeasy Mini kit (QIAGEN 217004)方法提取 RNA,分别用 U6 及 miR-19a 特异 RT 引物(锐博生物 ssd0904071008/ssD9831040135)进行逆转录,而后用 U6 及 miR-19a 对应的引物(锐博生物)进行荧光定量 PCR 检测(BIO-RAD 172-5201)。

取小鼠结肠进行 RNA 提取,参照试剂盒说明书进行:从 4 $^{\circ}$ C 取出 Trizol 恢复室温,预冷离心机到 4 $^{\circ}$ C。4 $^{\circ}$ C PBS 洗 1 次,加入 1 ml Trizol 后剪碎组织,玻璃匀浆器匀浆 15 次,收集到 EP 管内离心 15 min,15000 g,取上清。向上清中加入 200 μ l 氯仿,上下用力颠倒混匀 0.5 min,静置 3 min。4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 15 min。转移上层的水相到新的 EP 管内,150 μ l 吸 3 次,共 450 μ l。补充 200 μ l 的 DEPC 水,总体积即为 650 μ l,加入等体积

的酚氯仿,混匀,静置 3 min 后,4 $^{\circ}$ C 离心,12 000 r/min,15 min。取上清 500 μ l 到新的 EP 管内,167 μ l 吸 3 次。加入等体积的异丙醇,混匀,静置 10 min 后,4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 10 min。小心去掉上清,加入 1 ml 75%乙醇,上下颠倒,使沉淀块重悬起。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 10 min,小心去掉上清。晾干约 15 min,至管壁无液体。加入适量体积(20~30 μ l)的 DEPC 水溶解 RNA,58 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。取出 3 μ l 定量,测量 buffer: 10 mmol/L TrisCl (pH7.8),根据定量结果进行逆转录

逆转录:根据定量结果取 2 μ l RNA 补充 DEPC 水至 14 μ l;按锐博试剂盒进行逆转录。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件处理实验数据以均数 \pm 标准差表示,根据方差齐性采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 DAI 比较

模型组、白头翁组、5-ASA 组在造模后第 2 天即出现疾病发作,模型组在整个实验过程中炎症持续,无明显自愈倾向;而相对于模型组,白头翁汤和 5-ASA 组在治疗后 5 d 开始出现 DAI 增长减缓趋势。造模后第 7 天,与模型组比较,白头翁汤组及 5-ASA 组 DAI 明显低于模型组($P < 0.05$),提示白头翁汤可改善小鼠溃疡性结肠炎炎症程度。

2.2 各组小鼠结肠组织学比较

小鼠活动性溃疡性结肠炎模型造模成功,在模型组肠道粘膜出现正常腺体结构消失,炎症细胞大量浸润等改变。在 DSS+白头翁汤组也出现炎症反应,但炎症反应轻于 DSS 模型未用药物干预组,与阳性对照组 5-ASA 组相似。上述结果表明,白头翁汤对于改善实验性溃疡性结肠炎小鼠肠道炎症的组织病理学程度有一定的作用(图 1)。

2.3 白头翁汤对实验性小鼠溃疡性结肠炎 miR-19a 表达的影响

我们取对照处理、DSS 模型中及白头翁汤治疗组小鼠结肠组织进行 miR-19a 表达量 Q-PCR 检测,结果表明:DSS 处理可使结肠部分 miR-19a 较对照明显下降($0.19 \pm 0.08, P < 0.05$),而白头翁汤处理后可使 miR-19a 水平明显恢复($0.79 \pm 0.12, P < 0.05$),说明白头翁汤可能通过调控 miR-19a 的表达及功能发挥对溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用。

3 讨论

本研究发现,miR-19a 在活动性 UC 小鼠表达下调,与文献报道一致,说明 miR-19a 可能是参与 UC 发病的活跃的生物因子。MiR-19a 最早由 Ota 等^[12]克隆,位于

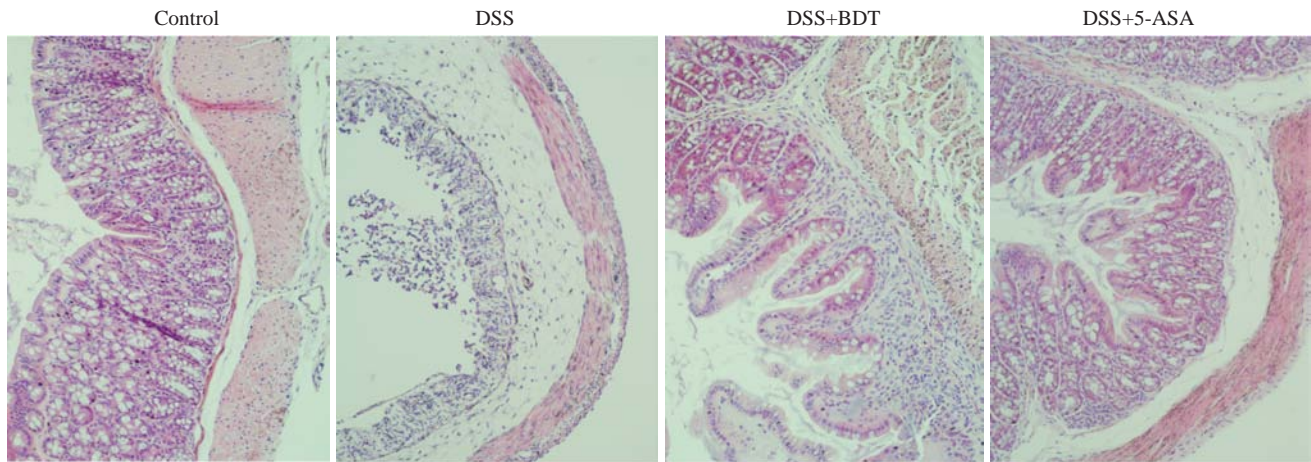


图1 各组小鼠结肠组织学比较

Fig.1 Histological examination of the intestines in different groups (HE staining, original magnification: ×200).

13q31.3,他们发现5个前体和7个成熟的microRNAs,其中 miR-19a 位于 C13ORF25 基因的 3'-UTR 区, Pezzolesi 等^[13]首次发现,是一个生物学保守的 miRNA。首先发现的 miR-19a 靶基因为磷酸酶及张力蛋白同源基因,并在 Cowden 综合症证实 miR-19a 可以调控 PTEN 以及其相关表型。

miR-19a 功能十分活跃:体外血肿瘤屏障模型中证实 miR-19a 在人脑微血管内皮细胞中的表达水平能显著增加血肿瘤屏障的通透性^[14]; miR-19a 在内皮细胞中主要作为抑制生长的基因,上调人脐静脉内皮细胞中 miR-19a 的表达水平可以抑制靶基因——细胞周期蛋白 D1 的表达,进而抑制内皮细胞增殖^[15]。

本研究证实, DSS 诱导的活动性溃疡性结肠炎 miR-19a 的表达增加,其表达水平与肠道炎症呈负相关,说明 miR-19a 在溃疡性结肠炎小鼠结肠炎症活动中可能扮演了重要角色。我们首次研究了中药白头翁汤对 miR-19a 的表达的影响,我们比较了白头翁处理组及对照组 miR-19a 的表达的差异,发现,白头翁处理组较对照组 miR-19a 表达增加,提示中药白头翁汤治疗可以增加 miR-19a 的表达,从而通过某种机制促进炎症的发生,白头翁汤治疗 UC 的机理,可能与 miR-19a 的功能有关。

因此,我们认为,白头翁汤治疗作用的机理之一,可能通过影响 miR-19a 的表达,从而起到炎症减轻、病情缓解的作用,进一步功能学深入研究有助于阐明白头翁治疗 UC 的作用机理。

参考文献:

- [1] 汪远平. 白头翁汤治疗溃疡性结肠炎 48 例[J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(5): 49.
- [2] 祝华君. 白头翁汤加味治疗溃疡性结肠炎 48 例疗效观察[J]. 浙江临床医学, 2002, 4(6): 453.
- [3] 张 弦, 翟新影. 加味白头翁汤治疗溃疡性结肠炎 68 例[J]. 福建中医

药, 2010, 41(2): 38-9.

- [4] 罗 明, 万恒荣, 陈海生, 等. 白头翁汤治疗溃疡性结肠炎 50 例分析[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2010, 16(4): 463-5.
- [5] Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, et al. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response[J]. Autoimmun Rev, 2012, 11(5): 305-14.
- [6] Wu F, Guo NJ, Tian H, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(1): 241-50.
- [7] Pekow JR, Kwon JH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(1): 187-93.
- [8] Dalal SR, Kwon JH. The role of microRNA in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterol Hepatol (NY), 2010, 6(11): 714-22.
- [9] Takagi T, Naito Y, Mizushima K, et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25 Suppl 1: S129-33.
- [10] Duttagupta R, DiRienzo S, Jiang R, et al. Genome-wide maps of circulating miRNA biomarkers for ulcerative colitis [J]. PLOS ONE, 2012, 7(2): e31241.
- [11] Bian Z, Li L, Cui J, et al. Role of miR-150-targeting c-Myb in colonic epithelial disruption during dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis and human ulcerative colitis [J]. J Pathol, 2011, 225(4): 544-53.
- [12] Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma [J]. Cancer Res, 2004, 64(9): 3087-95.
- [13] Pezzolesi MG, Platzer P, Waite KA, et al. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in cowden syndrome [J]. Am J Hum Genet, 2008, 82(5): 1141-9.
- [14] 王 萍, 刘云会, 薛一雪. miR-19a 对血肿瘤屏障通透性的影响[J]. 解剖科学进展, 2011, 17(4): 351-4.
- [15] Doebele C, Bonauer A, Fischer A, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells [J]. Blood, 2010, 115(23): 4944-50.

(编辑:陈望忠)