

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.02.012

罗格列酮对溃疡性结肠炎大鼠的保护作用及机制研究*

田伟刚¹ 任春秀^{2Δ} 于丽君³ 杨立清⁴ 吴长海⁵

(1 通辽职业学院药品食品系 内蒙古 通辽 028000;

2 内蒙古民族大学附属医院教研室 内蒙古 通辽 028007; 3 内蒙古民族大学医学院药理学系 内蒙古 通辽 028000;

4 内蒙古民族大学附属医院基因扩增实验室 内蒙古 通辽 028007; 5 内蒙古民族大学附属医院输血科 内蒙古 通辽 028007)

摘要 目的:探讨罗格列酮对溃疡性结肠炎大鼠的保护作用及其作用机制。**方法:**三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇复合法用于建立大鼠溃疡性结肠炎模型,8周龄健康成年雄性SD大鼠15只,随机分成3组,每组5只,分别为对照组、溃疡组和罗格列酮组。对照组为生理盐水灌肠和灌胃,模型组为TNBS/乙醇混合液灌肠和生理盐水灌胃,罗格列酮组则从灌肠造模成功后的第二天起,每天采用罗格列酮灌胃给药1次(5 mg/kg)。观察大鼠的一般活动状态,并记录各组大鼠的疾病活动指数(DAI),于灌肠后第60天处死大鼠,镜下观察并记录各组大鼠的结肠黏膜损伤指数(CDMI),苏木色精-伊红法(HE)染色后,镜下观察各组大鼠的结肠组织病理学改变,并进行组织学评分(HS)。生化法用于检测大鼠结肠组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和髓过氧化物酶(MPO)的含量。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)和免疫组化(IHC)法分别检测各组大鼠结肠组织中过氧化物酶增殖激活受体- γ (PPAR γ)、核转录因子- κ B(NF- κ B)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的mRNA和蛋白表达水平。**结果:**与对照组相比,溃疡组的DAI、CDMI和HS评分均显著增加($P<0.05$);SOD含量显著降低,MDA和MPO的含量显著增加($P<0.05$);PPAR γ 的mRNA和蛋白表达量显著降低($P<0.05$);NF- κ B和TNF- α 的mRNA和蛋白表达量显著增加($P<0.05$)。与溃疡组相比,罗格列酮组的大鼠DAI、CDMI和HS评分均显著降低($P<0.05$);结肠组织中SOD含量显著增加,MDA和MPO的含量显著降低($P<0.05$);PPAR γ 的mRNA和蛋白表达量显著增加($P<0.05$);NF- κ B和TNF- α 的mRNA和蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。**结论:**罗格列酮可以通过增加SOD和PPAR γ 表达,降低MDA、MPO、NF- κ B和TNF- α 表达来缓解炎症反应,对溃疡性结肠炎起到保护作用。

关键词:溃疡性结肠炎;PPAR γ ;NF- κ B;TNF- α ;罗格列酮

中图分类号:R-33; R574.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)02-248-06

Study on Protective Effect and Mechanism of Rosiglitazone on Ulcerative Colitis Rats*

TIAN Wei-gang¹, REN Chun-xiu^{2Δ}, YU Li-jun³, YANG Li-qing⁴, WU Chang-hai⁵

(1 Department of Food and Drug, Tongliao Vocation College, Tongliao, Inner Mongolia, 028000, China; 2 Teaching and Research Office, Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia, 028007, China;

3 Department of Pharmacy, Medical School of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia, 028000, China; 4 Laboratory of Gene Amplification, Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia, 028007, China; 5 Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia, 028007, China)

ABSTRACT Objective: To explore the protective effect of rosiglitazone on ulcerative colitis rats and its mechanism. **Methods:** Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)/ethanol complex was used to establish rat model of ulcerative colitis. 15 male SD rats aged 8 weeks were randomly divided into control group (n=5), ulcer group (n=5) and rosiglitazone group (n=5). The rats in the control group were treated with saline enema and intragastric administration. The rats in the model group, with TNBS/ethanol mixture and saline. The rosiglitazone group was administered with rosiglitazone (5 mg/kg) once a day from the second day after the success of establishing rat model of ulcerative colitis by enema. The general activities of the rats were observed and the disease activity indexes (DAI) of each group were recorded. The rats were sacrificed on the sixtieth day after enema. The histopathological changes of colonic tissue were observed under microscope. The histological score (HS) was performed. The content of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in colonic tissue of rats were detected by biochemical method. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry (IHC) were used to detect the expression of peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA and protein in colon tissue of each group.

* 基金项目:内蒙古自治区教育厅科研课题(NJSY111304)

作者简介:田伟刚(1981-),男,硕士,讲师,从事抗炎化合物合成方面的研究,E-mail: mzlgo@163.com

Δ 通讯作者:任春秀(1980-),女,硕士,主管检验师,从事乳腺癌细胞中蛋白质分离提取方面的研究,E-mail: uwnsgo@163.com

(收稿日期:2017-09-13 接受日期:2017-09-30)

Results: Compared with the control group, the DAI,CDMI and HS scores of ulcer group were significantly increased ($P<0.05$), the content of SOD was significantly decreased, the content of MDA and MPO were significantly increased ($P<0.05$), the expression of PPAR γ mRNA and protein were decreased significantly ($P<0.05$), the expression of NF- κ B and TNF- α mRNA and protein were increased significantly ($P<0.05$). Compared with the ulcer group, the DAI, CDMI and HS scores of the rosiglitazone group were significantly decreased ($P<0.05$); the content of SOD in the colon tissue was significantly increased, the content of MDA and MPO were significantly decreased ($P<0.05$), the expression of PPAR γ mRNA and protein were significantly increased ($P<0.05$), the expression of NF- κ B and TNF- α mRNA and protein were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Rosiglitazone can alleviate the inflammatory reaction by increasing the expression of SOD and PPAR γ and decreasing the expression of MDA, MPO, NF- κ B and TNF- α so as to play a protective role in ulcerative colitis.

Key words: Ulcerative colitis; PPAR γ ; NF- κ B; TNF- α ; Rosiglitazone

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R574.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)02-248-06

前言

溃疡性结肠炎是大肠黏膜的慢性非特异性炎症和病变,其临床治疗药物的副作用和不良反应均较为明显,因此急需寻找新的安全高效的药物^[1]。溃疡性结肠炎病理学基础为肠道炎症反应损伤,该过程与氧化应激反应密切相关^[2]。人正常生理状态下用于保护机体免受氧化应激损伤的防御系统保持动态平衡,如谷胱甘肽还原酶(Superoxide dismutase,SOD),抗氧化系统削弱或氧自由基生成过量时,生成脂质过氧化物,如丙二醛(Malondialdehyde,MDA),损伤细胞,另外髓过氧化物酶(Myeloperoxidase,MPO)的表达也反映中性粒细胞的炎症浸润程度^[3,4]。促炎和抗炎细胞因子的动态平衡保护机体免受炎症反应损伤,抑制溃疡性结肠炎进展。过氧化物酶增殖激活受体 γ (Peroxisome proliferator activated receptor- γ ,PPAR γ)、核转录因子- κ B(Nuclear factor- κ B,NF- κ B)和肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α ,TNF- α)等促炎或抑炎因子在肠道炎症反应中起重要作用^[5,6]。罗格列酮可通过PPAR γ 增加靶组织对胰岛素的敏感性,具有降血糖的作用,另外罗格列酮还具有许多降糖功能以外的作用,如抗炎和抗氧化应激等作用^[7,9]。目前关于罗格列酮在溃疡性结肠炎中的研究还较少,已有的研究大多停留在对治疗疗效的观察上,但具体的作用机制及作用方式目前尚不明确^[10,11]。本实验通过构建大鼠溃疡性结肠炎模型,探讨罗格列酮用于溃疡性结肠炎治疗的疗效及机制,为扩展罗格列酮的临床应用提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其分组

8周龄的健康成年雄性SD大鼠15只(购自兰州大学基础医学院医学实验动物中心,许可证号:SYXK(甘)2013-0003),体重(200 $\pm$ 15)g,随机分成3组,每组5只,分别为对照组、溃疡组和罗格列酮组。对照组采用生理盐水灌肠和灌胃,溃疡组采用TNBS/乙醇混合液灌肠和生理盐水灌胃,罗格列酮组则从灌肠造模成功后的第二天起,每天以罗格列酮灌胃给药1次(5mg/kg)。每天观察记录大鼠的体重、粪便性状、便血情况,观察时间段为灌肠或灌胃后的60天,60天后处死大鼠,实验结束。此时,按照疾病活动指数(DAI)来记录大鼠的疾病状态,在其中DAI评分的总分值为大鼠体重下降分数、大便性状分数和

大鼠便血分数总和的三分之一^[12]。本研究经通辽职业学院动物实验伦理委员会批准。

1.2 大鼠溃疡性结肠炎模型的建立

正式构建溃疡性结肠炎动物模型前先将大鼠禁食48h(但保持正常饮水),对大鼠进行腹腔麻醉(10%的水合氯醛,注射剂量为280mg/kg),将硅胶管从大鼠肛门处轻轻的插入到大鼠体内(深度约为8cm,硅胶管直径为2mm,硅胶管插入前先用石蜡润滑)。随后将三硝基苯磺酸(剂量为100mg/kg)和50%乙醇进行混匀,将该0.3mL的混合液从硅胶管注入大鼠体内,倒提大鼠尾部并保持至少5min,保证药液完全进入大鼠体内,将大鼠放回原位使其自然苏醒,保持正常供水及饲料供应饲养。

1.3 结肠组织标本的收集及免疫组化反应

于灌肠或灌胃后第60天处死大鼠,实验结束,10%水合氯醛用于麻醉大鼠,其注射剂量为280mg/kg,将大鼠固定到无菌手术台,保持仰卧的姿势,使用手术刀片轻轻划开腹部的正中,轻轻的分离出结肠组织,并沿着沿肠系膜纵向划开,用4℃的生理盐水或磷酸盐缓冲液轻轻将结肠组织冲洗干净,肉眼观察结肠组织的外观及形态,进行结肠黏膜损伤指数(CDMI)评分,观察结肠黏膜有无充血、水肿、糜烂或溃疡等现象,按其严重程度分为无(0分)、轻度(1分)、轻中度(2分)、中度(3分)、中重度(4分)和重度(5分)^[13]。随后将溃疡病变或损伤最为显著的结肠组织切下,浸泡在10%的中性甲醛溶液中,经我院病理科医生的常规固定、包埋后,制作切片,经HE染色后,根据镜下观察粘膜病变情况,进行组织学评分(HS),其中正常(0分);充血水肿,少许炎性细胞浸润(1分);浅表糜烂,炎性细胞浸润(2分);隐窝脓肿,粘膜坏死(3分);溃疡达粘膜下层及肌层(4分)^[14]。按照Dako两步法免疫组化试剂盒(DAKO,美国)的说明书进行操作,进行PPAR γ 、NF- κ B和TNF- α 的蛋白表达检测(CST,美国,货号分别为2435,8242,11948S),蛋白表达的定量方法:DAB染色,用计算机图像分析软件(Image-pro plus 6.0)对PPAR γ 、NF- κ B和TNF- α 蛋白表达阳性的细胞(胞浆呈棕黄色或棕褐色着色即为阳性)进行光密度(OD)检测,400X高倍镜下观察,每张切片取5个有代表性的不重复视野,检测蛋白表达阳性着色部位的累积光密度值和总面积值,计算二者比值,即为PPAR γ 、NF- κ B和TNF- α 的蛋白表达量,该部分的所有操作均由我院病理科完成。

1.4 大鼠结肠组织中MPO、SOD和MDA的含量检测

按 1.3 中的操作,每组取新鲜的结肠组织各 100 mg,置于含 2%烷基硫酸钠和 50 mmol/L 蛋白酶抑制剂的磷酸盐缓冲液中,4℃、12000 rpm 离心 20 min 后取上清液,严格参照试剂盒的说明书进行操作,分别检测 SOD 含量(SOD 检测试剂盒,南京建成生物工程所,A001-3)、MDA 含量(MDA 检测试剂盒,A003-2)和 MPO 含量(MPO ELISA 检测试剂盒,北京百奥莱博,HR0941)。将稀释的样品加样并盖上封板膜,轻摇后在 37℃ 反应 60 min,洗板 5 次,分别加入显色液 A 和 B,37℃ 下显色 10 min 后加入终止液,10 min 内读取 OD 值,检测仪器为 Multiskan MK3 酶标仪(Thermo,美国),据此绘制浓度标准曲线(纵坐标 -OD 值,横坐标 -标准液浓度),根据所测 OD 值找出标准曲线上对应的样本浓度,记录实验结果。每个样设置 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.5 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平检测

Trizol 提取法(Invitrogen,USA)提取结肠组织样品中的 mRNA,根据逆转录聚合酶链反应试剂盒(qRT-PCR 检测试剂盒,Takara,kit3.0)的说明书进行操作,检测设备为 BioRad IQTM5 Multicolor 实时荧光定量系统(BioRad,美国),每个等量 cDNA 使用对每个基因特异的引物扩增样品。其中 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 用于计算 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 基因的相对表达量, $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{gene}} - CT_{\text{GAPDH}})_{\text{target}} - (CT_{\text{gene}} - CT_{\text{GAPDH}})_{\text{control}}$,反应体系为 20 μ L,每组实验设置三个复孔。

1.6 统计分析

SPSS 15.0 软件用于统计学分析。实验数据为计量资料,均通过正态性检验,用 "均数 $\pm$ 标准差" 表示。多组间的数据比较采用单因素方差分析,两两比较为 LSD-t 检验。当 $P < 0.05$

时,则认为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 对照组、溃疡组和罗格列酮组的大鼠 DAI、CMDI 及 HS 评分比较

和对照组相比,溃疡组大鼠在造模成功后的一周内均出现不同程度的精神状态变差,毛皮粗糙无光泽,活动量、体重、进食和饮水显著降低,存在扎堆挤到角落的现象,另外大鼠的大便几乎不存在结块现象,大便变稀,颜色变浅,甚至有血便存在。实验结束处死大鼠后,镜下观察发现溃疡组大鼠的结肠黏膜上存在糜烂或水肿现象,结肠表面存在较多的浅小溃疡,结肠病变多位于下段,另外结肠黏膜及其下层的血管多存在充血的现象,可以观察到有较多的炎细胞浸润到周围组织,且中性粒细胞的数量也明显增加(图 1),且 DAI、CMDI 及 HS 评分显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

与溃疡组相比,罗格列酮组大鼠在造模成功用药 5-7 天后均出现不同程度的精神状态的好转,毛皮恢复光泽,进食饮水增加,且大便溏稀或便血状态在灌肠或灌胃后一个月内逐渐好转,体重回升,至造模成功 60 天时基本恢复至与对照相似的状态,且结肠黏膜表面存在的水肿、充血或糜烂现象已经得到明显改善和康复,另外镜下观察到结肠的黏膜及其浅层的中性粒细胞数量也明显减少,淋巴细胞浸润显著降低(图 1),DAI、CMDI 及 HS 评分显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 对照组、溃疡组和罗格列酮组的大鼠结肠 SOD、MDA 和 MPO 含量比较

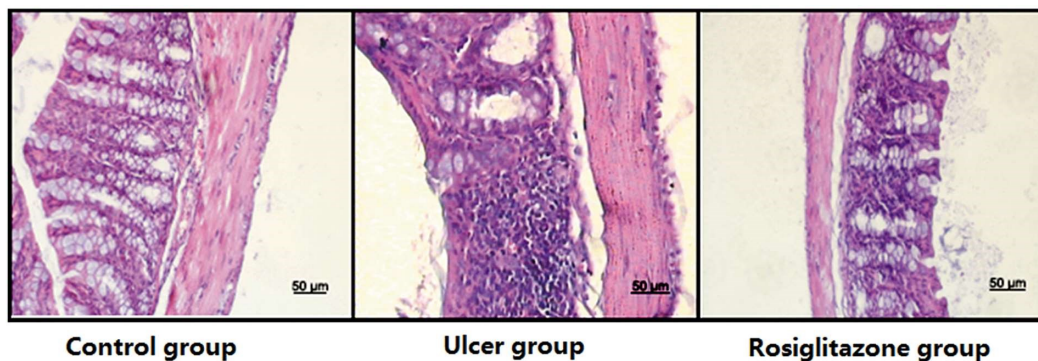


图 1 对照组、溃疡组和罗格列酮组大鼠结肠组织的 HE 染色结果的代表性图片(200 $\times$)

Fig. 1 Typical pictures of HE staining in colon tissue of rats in control group, ulcer group and rosiglitazone group (200 $\times$)

表 1 对照组、溃疡组和罗格列酮组的大鼠 DAI、CMDI 及 HS 评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

Table 1 Comparison of DAI, CMDI and HS scores among control group, ulcer group and rosiglitazone group($\bar{x} \pm s$, scores)

Groups	DAI	CMDI	HS
Control group(n=5)	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.426 $\pm$ 0.171
Ulcer group(n=5)	1.533 $\pm$ 0.293 ^a	1.624 $\pm$ 0.451 ^a	2.830 $\pm$ 0.706 ^a
Rosiglitazone group(n=5)	0.428 $\pm$ 0.175 ^{ab}	0.825 $\pm$ 0.357 ^{ab}	1.097 $\pm$ 0.524 ^b
F	48.231	9.675	17.265
P	0.000	0.013	0.003

Note: compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the ulcer group, ^b $P < 0.05$.

与对照组相比,溃疡组大鼠的 SOD 含量显著降低,MDA 和 MPO 的含量显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与溃疡组相

比,罗格列酮组大鼠的 SOD 含量显著增加,MDA 和 MPO 的含量显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 对照组、溃疡组和罗格列酮组的 SOD、MDA 和 MPO 含量($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Content of SOD, MDA and MPO in control group, ulcer group and rosiglitazone group ($\bar{x}\pm s$)

Groups	SOD(μ /g)	MDA(μ /g)	MPO(nmol/g)
Control group(n=5)	25.386 $\pm$ 5.462	16.967 $\pm$ 2.578	0.315 $\pm$ 0.057
Ulcer group(n=5)	9.843 $\pm$ 2.519 ^a	83.751 $\pm$ 9.927 ^a	1.424 $\pm$ 0.415 ^a
Rosiglitazone group(n=5)	20.557 $\pm$ 2.630 ^b	42.372 $\pm$ 6.184 ^b	0.495 $\pm$ 0.111 ^b
F	13.216	71.296	16.966
P	0.006	0.000	0.003

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the ulcer group, ^b $P<0.05$.

2.3 对照组、溃疡组和罗格列酮组的大鼠结肠 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的 mRNA 表达比较

与对照组大鼠的结肠组织中检测到的 PPAR γ 的 mRNA 相对表达量相比,溃疡组和罗格列酮组的表达量呈现出显著减少的现象,NF- κ B 和 TNF- α 的 mRNA 表达量显著增加,差异

具有统计学意义($P<0.05$)。与溃疡组相比,罗格列酮组大鼠的结肠组织中 PPAR γ 的 mRNA 表达量显著增加,NF- κ B 和 TNF- α 的 mRNA 表达量显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 对照组、溃疡组和罗格列酮组的 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Expression of PPAR γ , NF- κ B and TNF- α mRNA in control group, ulcer group and rosiglitazone group ($\bar{x}\pm s$)

Groups	PPAR γ	NF- κ B	TNF- α
Control group(n=5)	1.479 $\pm$ 0.050	0.052 $\pm$ 0.005	0.032 $\pm$ 0.010
Ulcer group(n=5)	1.087 $\pm$ 0.050 ^a	0.437 $\pm$ 0.014 ^a	0.415 $\pm$ 0.027 ^a
Rosiglitazone group(n=5)	1.276 $\pm$ 0.067 ^{ab}	0.079 $\pm$ 0.007 ^{ab}	0.128 $\pm$ 0.013 ^{ab}
F	36.423	593.157	350.557
P	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the ulcer group, ^b $P<0.05$.

2.4 对照组、溃疡组和罗格列酮组的大鼠结肠 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的蛋白表达比较

与对照组相比,溃疡组大鼠的结肠上皮细胞中 PPAR γ 蛋白表达量显著降低,少见 PPAR γ 表达的阳性细胞大多位于胞浆中(胞浆呈棕黄色或棕褐色着色即为阳性);NF- κ B 和 TNF- α 的蛋白表达量显著增加,以胞浆表达为主,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与溃疡组相比,罗格列酮组大鼠的结肠上皮细胞中 PPAR γ 蛋白表达量显著增加,以胞浆表达为主;NF- κ B 和

TNF- α 的蛋白表达量显著降低,少见 NF- κ B 和 TNF- α 表达的阳性细胞,大多位于胞浆中,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

3 讨论

本实验中溃疡组大鼠在造模成功后,相较于对照组,大鼠出现精神萎靡、进食减少、腹泻、体重降低等症状,上述症状与溃疡性结肠炎患者的临床表现相似;溃疡组的病理学观察也发

表 4 对照组、溃疡组和罗格列酮组的 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Expression of PPAR γ ,NF- κ B and TNF- α proteins in control group,

ulcer group and rosiglitazone group ($\bar{x}\pm s$)

Groups	PPAR γ	NF- κ B	TNF- α
Control group(n=5)	0.039 $\pm$ 0.004	0.020 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.001
Ulcer group(n=5)	0.008 $\pm$ 0.001 ^a	0.069 $\pm$ 0.007 ^a	0.035 $\pm$ 0.005 ^a
Rosiglitazone group(n=5)	0.031 $\pm$ 0.006 ^b	0.032 $\pm$ 0.005 ^{ab}	0.014 $\pm$ 0.006 ^{ab}
F	43.593	78.337	35.113
P	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the ulcer group, ^b $P<0.05$.

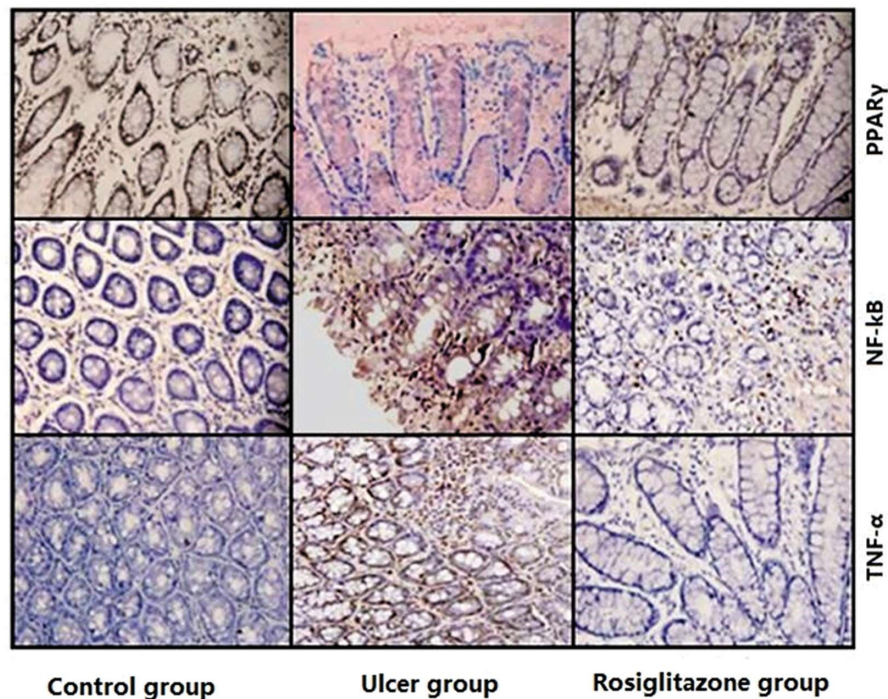


图2 对照组、溃疡组和罗格列酮组大鼠结肠组织的 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的蛋白的代表性图片(400 $\times$)

Fig. 2 Typical pictures of PPAR, NF- κ B and TNF- α proteins in colon tissue of rats
in control group, ulcer group and rosiglitazone group(400 $\times$)

现大鼠的结肠粘膜表面出现了较多的浅小溃疡、水肿、出血、甚至糜烂的现象,镜下也可以观察到较多的炎细胞浸润周围组织,并可观察到较多的中性粒细胞,上述特征与人类溃疡性结肠炎患者的病理学表现相似,该实验结果表明大鼠溃疡性结肠炎的动物模型造模成功,而与已有研究相比,该研究在构建溃疡性大鼠模型时,给药时间从造模结束到实验结束仅8天,罗格列酮的用药剂量为2、4和8 mg/kg,本实验中我们对此做出改进,观察时长延长至造模后60天,根据上述文献将罗格列酮的用药剂量调整为5 mg/kg,减少实验分组,使实验结果更加详细和直观的反映罗格列酮用于治疗溃疡性结肠炎的疗效及机制。而与罗格列酮组的大鼠比较,上述大鼠的一般活动状态和病理学表现均得到显著的改善,即反应大鼠状态的DAI、体现大鼠病理学改变的结肠黏膜CDMI、记录组织学改变的HS评分均显著降低,表明罗格列酮可显著改善溃疡性结肠炎的症状,降低炎症反应,符合已有研究中罗格列酮除了降糖作用外还可降低炎症反应的结论^[15]。

与上述大鼠活动状态及病理学改变类似,通过生物学检测我们发现溃疡组大鼠的SOD含量显著降低,MDA和MPO的含量显著增加,而罗格列酮组可显著逆转上述改变。目前,已有研究认为溃疡性结肠炎的发病因素主要是遗传、环境或免疫等所致的,溃疡性结肠炎的病理过程与氧自由基的过量产生及其带来的脂质的过氧化反应密切相关。氧自由基可发挥杀菌、消毒、促炎症反应和促水肿的作用,但其作用方式并无明显的选择特异性,所以氧自由基在发挥上述作用时也可能引起对正常细胞或组织的损伤。一般而言,体内的氧自由基的数量保持动态平衡,保持机体免受外界的破坏或损失,在该过程中SOD、维生素等可发挥重要作用。一旦动态平衡被破坏,过量的

氧自由基就会溢到细胞外,直接对细胞外的临近细胞和组织产生过氧化损伤,另外氧自由基还可以和细胞膜表面的不饱和脂肪酸发生化学结合,最终产生MDA等多种的脂质过氧化或降解产物,导致中性粒细胞中的MPO增加,增加炎症浸润等,降低细胞膜的膜流动性的同时还改变通透性,使Ca²⁺离子向细胞膜内的流动增加,导致细胞膜内的Ca²⁺离子过多,使细胞受到严重损伤并最终死亡,另外氧自由基可使蛋白质大分子产生变性,使蛋白酶的活性丧失,造成炎症渗出或水肿的现象^[16]。即氧自由基的过量生成可破坏体内清除氧自由基的防御系统的平衡状态,导致清除氧自由基的SOD生成减少,过氧化脂质降解产物MDA和过氧化物酶MPO的生成增加,促进炎症反应,损伤细胞和组织,而溃疡性结肠炎会导致组织中产生大量的氧自由基,与上述过程一致,本实验中溃疡组大鼠中SOD含量降低,MDA和MPO含量增加,而罗格列酮可逆转上述改变,表明罗格列酮可减弱溃疡性结肠炎所致的溃疡性氧化应激和脂质过氧化过程,增加机体的抗氧化能力,保护结肠细胞或组织免受氧自由基的损伤。

肠道炎症反应中细胞因子起到了关键作用,其中细胞因子NF- κ B为一种重要的促炎细胞因子,可抑制细胞凋亡相关的炎症细胞,延长或增加组织的炎症损伤,TNF- α 为另一种重要的促炎细胞因子,TNF- α 的过表达与溃疡性结肠炎的临床症状密切相关,如炎症、厌食和体重减轻等^[17,18]。PPAR γ 是转录因子的核激素受体超家族成员,其中罗格列酮为PPAR γ 的合成配体^[19]。炎症反应中促炎因子NF- κ B和TNF- α 的生成会增加,PPAR γ 的生成则会减少,本实验中我们观察到的溃疡组中大鼠的PPAR γ 、NF- κ B和TNF- α 的mRNA和蛋白表达相一致,说明溃疡性结肠炎大鼠中炎症反应增强,而罗格列酮对上述变

化的逆转表明罗格列酮可降低炎症反应,保护机体免受损伤,上述结果与罗格列酮可显著改善小鼠结肠炎症状,缓解溃疡性结肠炎的各种症状等研究的内容相一致^[20]。但相比于已有研究,本研究的创新点在于首次对罗格列酮用于溃疡性结肠炎大鼠后,对结肠粘膜中 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的蛋白表达进行了定量分析,从 mRNA 和蛋白表达两个方面对促炎因子 PPAR γ 、NF- κ B 和 TNF- α 的转录及蛋白翻译过程进行直观的定量分析,为罗格列酮发挥保护溃疡性结肠炎提供理论支持。

综上所述,罗格列酮在溃疡性结肠炎中,可发挥抑制炎症反应、并保护机体免受氧化损伤的作用。

参考文献(References)

- [1] Chotivitayatarakorn P,Vilaichone RK.Colorectal Cancer and Precancerous Lesions Associated with Ulcerative Colitis in Thailand [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(8): 2123-2126
- [2] Kim SH, Jang S, Sung Y, et al. Use of Novel Oral Anticoagulant to Treat Pulmonary Thromboembolism in Patient with Ulcerative Colitis Superinfected Cytomegalovirus Colitis [J]. Korean J Gastroenterol, 2017, 70(1): 44-49
- [3] Zheng XY, Lv YF, Li S, et al. Recombinant adeno-associated virus carrying thymosin β 4 suppresses experimental colitis in mice [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(2): 242-255
- [4] Zhao Y, Sun Y, Ding Y, et al. GL-V9, a new synthetic flavonoid derivative,ameliorates DSS-induced colitis against oxidative stress by up-regulating Trx-1 expression via activation of AMPK/FOXO3a pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 26291-26307
- [5] Cordaro M, Impellizzeri D, Gugliandolo E, et al. Adelmidrol,a Palmitoylethanolamide Analogue,as a New Pharmacological Treatment for the Management of Inflammatory Bowel Disease [J]. Mol Pharmacol, 2016, 90(5): 549-561
- [6] Ávila-Román J, Talero E, Rodríguez-Luna A, et al. Anti-inflammatory effects of an oxylipin-containing lyophilised biomass from a microalga in a murine recurrent colitis model[J]. Br J Nutr, 2016, 116(12): 2044-2052
- [7] Ishida E, Kim-Muller JY, Accili D. Pair Feeding, but Not Insulin, Phloridzin, or Rosiglitazone Treatment, Curtails Markers of β -Cell Dedifferentiation in Mice[J]. Diabetes, 2017, 66(8): 2092-2101
- [8] Ku YH, Cho BJ, Kim MJ, et al. Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2017, 18(1): 62
- [9] Yu W, Mi L, Long T. Efficacies of rosiglitazone and retinoin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(1): 609-615
- [10] 陈淑娜, 刘若丹. 罗格列酮联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎对 IL-1 β 、TNF- α 的影响[J].广西医学, 2011, 33(4): 432-434
Chen Shu-na, Liu Ruo-dan. Influence of Rosiglitazone and Mesalazine Combination for Ulcerative Colitis on IL-1 β , TNF- α [J]. Guangxi Medical Journal, 2011, 33(4): 432-434
- [11] Celinski K, Dworzanski T, Fornal R, et al. Comparison of the anti-inflammatory and therapeutic actions of PPAR-gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in experimental colitis [J]. J Physiol Pharmacol, 2012, 63(6): 631-640
- [12] 高观祯,孔玉婷,汪惠勤,等.服用温度对葛根芩连汤治疗大鼠溃疡性结肠炎药效的影响[J].中草药, 2016, 47(16): 2897-2901
Gao Guan-zhen, Kong Yu-ting, Wang Hui-qin, et al. Effect of administration temperature on efficacy of Gegen Qinlian Decoction on DSS-induced ulcerative colitis in rats [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(16): 2897-2901
- [13] 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
Sun Chun-xia, Huo Yong-li, Guo Xi-jun, et al. Repairing Effect of Huazhuo Jiedu Yukui Formula on Mucosal Damage of Rats with Ulcerative Colitis[J]. China Pharmacy, 2017, 28(10): 1329-1332
- [14] 钟刚,何双艳,姜黄素对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎的保护作用 [J].四川医学, 2016, 37(4): 387-389
Zhong Gang, He Shuang-yan. Protective Effect of Curcumin on DSS Induced Ulcerative Colitis in Mice[J]. Sichuan Medical Journal, 2016, 37(4): 387-389
- [15] Celinski K, Dworzanski T, Fornal R, et al. Comparison of anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in prophylactic treatment of experimental colitis [J]. J Physiol Pharmacol, 2013, 64(5): 587-595
- [16] Petronilho F, Michels M, Danielski LG, et al. Diphenyl diselenide attenuates oxidative stress and inflammatory parameters in ulcerative colitis: A comparison with ebselen[J]. Pathol Res Pract, 2016, 212(9): 755-760
- [17] Chae HS, You BH, Song J, et al. Mangosteen Extract Prevents Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice by Suppressing NF- κ B Activation and Inflammation [J]. J Med Food, 2017, 20(8): 727-733
- [18] Nourian M, Chaleshi V, Pishkar L, et al. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression level and the rs1799964 polymorphism of the TNF- α gene in peripheral mononuclear cells of patients with inflammatory bowel diseases [J]. Biomed Rep, 2017, 6(6): 698-702
- [19] Koo JB, Nam MO, Jung Y, et al. Anti-fibrogenic effect of PPAR- γ agonists in human intestinal myofibroblasts [J]. BMC Gastroenterol, 2017, 17(1): 73
- [20] 牛梦婕,李瑛,杭天星,等. 罗格列酮对低氧性肺动脉高压大鼠 PPAR γ 和 PTEN 表达的影响[J].现代生物医学进展, 2016, 16(17): 3217-3222
Niu Meng-jie, Li Ying, Hang Tian-xing, et al. Effect of Rosiglitazone on Expression of PPAR γ and PTEN in Rats with Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(17): 3217-3222