

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.04.004

中药缓溃乐对溃疡性结肠炎小鼠 HPA 轴和 5-HT 信号通路相关分子的影响*

木艾塔尔·艾斯卡尔^{1#} 阿依孜木姑·阿卜杜外力^{1#} 马依热·努尔买买提² 朱稷蔚¹文滔¹ 潘文涛¹ 王汉铭¹ 卡思木江·阿西木江^{3,4△}

(1 新疆医科大学 新疆 乌鲁木齐 830017; 2 新疆医科大学动物实验中心 新疆 乌鲁木齐 830001;

3 新疆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 新疆 乌鲁木齐 830017;

4 新疆地方病分子生物学重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要 目的:探讨中药缓溃乐(HKL)对溃疡性结肠炎小鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴以及 5-羟色胺(5-HT)信号通路相关分子的影响。**方法:**C57BL/6 小鼠(38 只)随机分成 HKL 干预组(HKL 组)、5-氨基水杨酸干预组(5-ASA 组)、溃疡性结肠炎模型组(UC 组)和正常组。前三组小鼠用 2%葡聚糖硫酸钠(Dextran sodium sulfate, DSS)干预 7 天,构建小鼠 UC 模型,同时分别用 HKL、5-ASA 和蒸馏水灌胃干预 14 天。每天观察动物一般状态、粪便性状。在干预结束后采集血清和结肠组织,采用 HE 染色法评价各组小鼠结肠组织完整性、损伤或愈合程度。酶联免疫吸附法测定血清中促肾上腺皮质激素(ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、皮质醇(CORT)、5-羟色胺(5-HT)、犬尿氨酸(KYN)和色氨酸(TRP)的含量;RT-qPCR 法检测结肠组织中 5-羟色胺转运蛋白(SERT)和色氨酸羟化酶 I(TPH1)的 mRNA 水平。**结果:**HKL 和 5-ASA 组小鼠结肠组织损伤部分恢复。UC 小鼠血清 ACTH、KYN、TRP 和 5-HT 含量显著高于正常组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 CRH 含量显著低于正常组($P<0.001$);与 UC 组比较,HKL 组小鼠血清中 CORT、ACTH、KYN 和 TRP 的含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),CRH 含量显著升高($P<0.01$);与正常组相比,UC 组小鼠结肠组织中 TPH1 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$);与 UC 组相比,HKL 组 TPH1 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$),而 SERT 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。**结论:**UC 小鼠体内 HPA 轴过度活化,5-HT 信号通路发生异常,肠道炎症明显,中药 HKL 抑制 HPA 轴的过度激活,并对 5-HT 信号通路相关分子的表达产生影响。

关键词: 溃疡性结肠炎;HPA 轴;5-HT 信号通路;中药缓溃乐**中图分类号:** R-33;R574.62;R242 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2024)04-617-07

The Effect of Huan Kui Le on HPA Axis and 5-HT Signal Pathway Related Molecules in UC Mice*

MUAITAER·Aisikaer[#], AYZIMUGULI·Abuduwalli[#], MAYIRE·Nuermaiti², ZHU Ji-wei¹,WEN Tao¹, PAN Wen-tao¹, WANG Han-ming¹, KASIMUJIANG·Aximujiang^{3,4△}

(1 Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830017, China;

2 The Animal Experiment Center of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830001, China;

3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830017, China;

4 Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology for Endemic Disease, Urumqi, Xinjiang, 830017, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of traditional Chinese medicine (TCM) Huan Kui Le (HKL) on key molecules of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and 5-HT signaling pathway in ulcerative colitis (UC) mice. **Methods:** C57BL/6 mice (n=38) were randomized into HKL intervention group (HKL group), 5-aminosalicylic acid intervention group (5-ASA group), UC model group (UC group) and normal group. The first three groups of mice were intervened with 2% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days to build a mouse UC model. At the same time HKL, 5-ASA and distilled water were gavaged for 14 days from the first day of DSS intervention, respectively. Observed the general status and faecal traits of each mouse. Serum and colon tissue were collected after 14 days. HE staining histopathological tests were used to evaluate colon tissue integrity, injury degree, and healing of each mouse. The protein expression levels of Adrenocorticotrophic hormone (ACTH), Corticotropin releasing hormone (CRH), Cortisol (CORT), 5-Hydroxytryptamine (5-HT), Tryptophan (TRP), and Kynurenine (KYN) in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA levels

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81760754);大学生创新创业训练计划项目(202210760022;S202110760003)

为共同第一作者

作者简介:木艾塔尔·艾斯卡尔,本科,E-mail: 2401459324@qq.com;

阿依孜木姑·阿卜杜外力,本科,研究方向:基础医学,E-mail: 1219013806@qq.com

△ 通讯作者:卡思木江·阿西木江,博士,副教授,E-mail: Dinar0817@126.com

(收稿日期:2023-10-22 接受日期:2023-11-18)

of SERT and TPH1 were determined by RT-qPCR. **Results:** The colonic tissue injury of mice treated with HKL and Chinese medicine recovered. Compared to the Normal group, the serum content of ACTH, KYN, TRP and 5-HT was significantly higher ($P<0.05$ or $P<0.01$) and CRH content was significantly lower in UC group ($P<0.001$). Compared to the UC group, the serum content of CORT, ACTH, KYN and TRP was significantly decreased in HKL group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the CRH content was significantly increased ($P<0.01$). The mRNA expression level of TPH1 in the colon tissue of the UC group was significantly higher than Normal group ($P<0.01$). Compared to the UC group, the mRNA expression level of TPH-1 was significantly decreased ($P<0.05$), and SERT was significantly increased ($P<0.01$) in HKL group. **Conclusion:** In UC mice, HPA axis is hyperactivated, 5-HT signaling pathway is abnormal, and intestinal inflammation is obvious. The HKL has regulatory effects on the excessive activation of HPA axis, and has impacts on the expression of molecules related to 5-HT signaling pathway.

Key words: Ulcerative colitis; HPA axis; 5-HT signal pathway; Huan Kui Le

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R574.62; R242 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)04-617-07

前言

溃疡性结肠炎(UC)是一种原因不明的弥漫性非特异性炎症,从直肠侧持续损害结肠黏膜,通常导致糜烂和溃疡^[1],其发病机制尚未完全明确。目前国内外研究人员认为 UC 的发生发展与遗传、环境、肠道菌群和神经内分泌等多种因素有关^[2],而近几年在 UC 的发病机制研究中大脑和肠道的双向交流及相互作用关系也越来越被关注。

下丘脑-垂体-肾上腺轴(The hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)是肠脑交流的重要分支^[3]。由下丘脑所分泌的促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin releasing hormone, CRH)作用于垂体前叶释放促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotrophic hormone, ACTH),而肾上腺皮质在 ACTH 的作用下可以合成皮质醇(Cortisol, CORT)。CORT 可以反馈作用于下丘脑和垂体(分别抑制 CRH 和 ACTH 的合成与分泌),形成反馈调节环路,即形成 HPA 轴。HPA 轴的过度活化可能导致 HPA-炎症信号调控失调与各种炎症因子的异常激活,促进 UC 的发生发展。5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)作为中枢神经系统(Central nervous system, CNS)重要的神经递质,与 HPA 轴存在广泛的相互联系^[4,5]。5-HT 能神经元支配下丘脑室旁核分泌 CRH 的细胞释放 CRH,进而影响 HPA 轴功能,同时 CRH、ACTH 及 CORT 也反作用于 5-HT 能神经元细胞^[6],抑制其活性。HPA 轴作为机体的反馈调节系统参与控制应激反应,调节体内各级内分泌腺和激素水平,是神经内分泌网络的重要枢纽。高水平 CORT 通过海马中盐皮质激素(Mineralocorticoid, MR)和糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)调节中缝核 5-HT 神经元活性,引起 5-HT 传导功能受损^[7],5-HT 系统与 HPA 轴共同组成的神经内分泌回路,是调控应激反应的关键因素。说明 HPA 轴与 5-HT 系统两者之间联系紧密,构成了复杂的网络系统并相互影响^[8,9]。因此,分析和研究 HPA 轴和 5-HT 通路之间的相互作用关系为 UC 发病机制和药物干预机制研究中非常关键。

先前研究表明,中药以及植物来源的生物活性化合物可能是治疗 UC 的重要突破点,其具有 UC 治疗效果和较高的生物安全性^[10,11]。本研究团队研发的中药复方缓溃乐混悬剂(HKL)为十种中药材组成的中药复方制剂,以往对此药的药效学研究显示, HKL 对大鼠 UC 的治疗效果明显^[12],但治疗的分子机制

尚未明确,因此本文在国内外文献报道及前期相关实验基础上,旨在通过 HKL 干预 DSS 诱导的 UC 小鼠后,检测 HPA 轴和 5-HT 信号通路相关信号分子的变化,探讨 HKL 对 HPA 轴和 5-HT 信号通路关键信号分子的影响,为 HKL 治疗 UC 的分子机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量为 18-22 g,购于新疆医科大学动物实验中心。各组小鼠给予标准饲料,自由饮水和进食,自然采光,温度 25℃左右,相对湿度 60%-80%。

1.2 实验药物

HKL: HKL 是十种中药材组成的复方混悬液,包括琥珀、天竺黄、石榴花、赤石脂、黄连、拳参、没食子、血竭、车前子和温楞子等。HKL 按照处方要求制备,药物制备工艺已授权国家发明专利^[13],小鼠给药剂量为 2.6 g/kg。5-氨基水杨酸给药剂量为 150 mg/kg。

1.3 实验仪器与试剂

DSS(MP, Mw:36000-50000 Da),乙醇(分析纯 国产),生理盐水(国产),小鼠血清 ACTH、5-HT、CRH、CORT、KYN、TRP ELISA 试剂盒(伊来瑞特 武汉),逆转录试剂盒(全式金 北京),SYBR® Green Real-time PCR 试剂盒(全式金 北京),4%多聚甲醛(Biosharp 安徽),引物(生工基因 上海),分光光度计(NaNo DroP),低温离心机(Eppendorf 德国),荧光倒置显微镜(莱卡德国),荧光定量 PCR 仪(ABI 7500, QuantStudio™ Real-Time PCR System),荧光倒置显微镜(德国、莱卡公司),移液器(德国、Eppendorf),灌胃针,水浴锅,移液器(Eppendorf 德国),TE,苏木素, PBS, 蒸馏水等。

1.4 小鼠 UC 模型建立与分组

取 38 只雄性 C57BL/6 小鼠适应性喂养 7 天后进行实验。将小鼠随机分为 UC 组(n=10)、HKL 组(n=10)、5-ASA 组(n=10)和正常组(n=8)。除正常组,其他组小鼠均用 2% 的 DSS 干预 7 天(相应量的 DSS 溶液加入小鼠饮用水中)建立小鼠 UC 模型。DSS 干预第一天起 HKL 组灌胃 0.3 mL HKL 药液,5-ASA 组灌胃 0.3 mL 5-ASA 药液,UC 组和正常对照组灌胃同等体积的生理盐水,所有组灌胃一天一次,连续 14 天。给药期间将记录动物的行为表现、精神状态、粪便状况等。

1.5 标本采集

药物干预 14 天后处理动物 (处理动物前一天晚上所有动物禁食不禁水),采集全血并离心获得血清,分装后置于 -80°C 保存备用。采集从肛门到盲肠的结肠组织标本,结肠进行长度测量后分两段,一部分用于 HE 染色组织病理学检测,另一部分用于相关分子实验。

1.6 HE 染色组织病理学检查

将保存于 4%多聚甲醛固定的结肠组织流水清洗 2 小时后进行常规脱水、透明化、石蜡包埋、切片、烤片、HE 染色,并于光学显微镜下进行组织病理学检查。HE 染色具体步骤如下:① 将石蜡切片放入烘箱 (60°C) 1 小时;② 脱蜡:放入二甲苯 I、二甲苯 II 中各 10 分钟;③ 覆水:放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇各 5 分钟,自来水洗 5 分钟;④ 染色:苏木素染色 2 分钟,自来水冲洗 2 分钟;⑤ 分化:5%的乙酸分化液分化 5 秒,自来水冲洗 5 分钟;⑥ 染色:伊红染色 4 分钟,自来水冲洗 5 分钟;⑦ 脱水:放入 75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 中各 5 分钟,放入二甲苯 I、二甲苯 II 中各 5 分钟;⑧ 封片:组织中滴中性树胶,封片,干燥后阅片。

1.7 ELISA 法测定血清中 ACTH、5-HT、CRH、CORT、KYN、TRP 的含量

按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作。待孵育结束后,立刻使用酶标仪检测各孔样品的吸光度,波长设置为 450 nm,根据标准曲线计算各组小鼠血清中 ACTH、5-HT、CRH、CORT、KYN、TRP 的含量。

1.8 RT-qPCR 法检测结肠组织中 TPH1 和 SERT 的 mRNA 水平

采用 TRIZOL 法提取结肠组织总 RNA,用 NanoDrop 超微量分光光度计测定所提取的 RNA 样品的浓度和纯度。具体步骤如下:

1) 将冻存的小鼠结肠组织切成 50 mg 左右放入 2 mL EP 管,每 EP 管中放入 4 mm 研磨珠 2 个,加 TRIZOL 1 mL,加 RNA 提取试剂 0.2 mL 后放入研磨仪中研磨 60 秒,并通过离心柱法提取 RNA。

2) 经鉴定后取 1 μg RNA 逆转录合成 cDNA 并利用荧光定量试剂盒及设计合成的引物(表 1)准备 PCR 样本。PCR 扩增操作在 ABI7500(QuantStudio™ Real-Time PCR System)系统下进行。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Oligo Name	Sequence (5 to 3)	Length
mouse β -actin-F	AGA GGG AAA TCG TGC GTG ACA TCA AAG AG	29
mouse β -actin-R	GAT GCC ACA GGA TTC CAT ACC CAA GAA GG	29
TPH-1-F	CAT CCG TCC TGT GGC TGG TTA C	22
TPH-1-R	AGG TGT CTG GCT CTG GAG TGT AG	23
SERT-F	CGT CGT CGT GTC TTG GTT CTA TGG	24
SERT-R	ACA GGA GAA ACA GAG GGC TGA TGG	24

3)PCR 扩增条件为:① 保温阶段: 94°C 30 秒;② PCR 阶段: 94°C 5 秒、 60°C 30 秒;③ 熔解曲线阶段: 95°C 15 秒、 60°C 1 分钟、 95°C 1 秒;上述步骤循环 40 次。

1.9 统计学处理

计量资料数据均用 GraphPad Prism 8.0.2 进行统计学分析,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用独立样本的 t 检验。统计结果用 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 表示。

2 结果

2.1 一般状态、结肠长度、肝脾重量变化

正常组小鼠在饲养期间反应灵敏、精神状况良好,粪便形状无异常;其他三组小鼠从 DSS 干预后出现腹泻、稀便以及血便等症状,造模初期出现脾气暴躁、相互咬伤等精神异常现象;与 UC 组相比,随着给药时间的延长 HKL 组、5-ASA 组的小鼠精神状态和粪便成形情况有所好转。比较各组小鼠结肠长度变化发现,UC 组小鼠结肠长度明显缩短、充血、粘连,结肠宽度变大 ($P<0.05$)。除正常组外,各干预组小鼠结肠仍有部分充血、水肿,但较 UC 组相比,HKL 和 5-ASA 干预组此现象有所减轻,结肠长度发生明显变化,见图 1。

比较各组小鼠肝脏与脾脏重量,与正常组相比,其他各组

小鼠脾脏重量增高,且具有统计学意义 ($P<0.01$),四组小鼠肝脏重量无统计学差异 ($P>0.05$),见图 2。

2.2 各组小鼠结肠组织病理学变化

HE 染色组织病理学检测结果显示,正常组小鼠结肠组织结构正常;而 UC 组小鼠结肠组织损伤较严重,腺体结构基本消失,可观察到溃疡;HKL 组小鼠结肠组织虽有损伤,但与 UC 组相比较轻,且可以观察到结肠损伤明显好转,黏膜固有层炎性细胞浸润较少;5-ASA 组与 UC 组相比,结肠结构清晰,且结肠黏膜基本恢复完整,炎细胞浸润较少,见图 3。

2.3 各组小鼠血清中 HPA 相关指标的含量变化

ELISA 结果显示,UC 小鼠血清中 ACTH 水平显著高于正常组 ($P<0.05$),CORT 水平有升高趋势。但 UC 组小鼠血清中 CRH 水平低于正常组 ($P<0.001$)。HKL 组小鼠血清中 ACTH、CORT 水平低于 UC 组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 CRH 水平高于 UC 组 ($P<0.01$)。见图 4。

2.4 各组小鼠血清中 5-HT 信号通路相关指标的含量变化

ELISA 结果显示,UC 小鼠血清中 5-HT、TRP、KYN 含量均显著高于正常组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与 UC 组相比,HKL 组小鼠血清中 TRP、KYN 含量明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),5-HT 水平有所下降但无显著差异 ($P>0.05$)。见图 5。

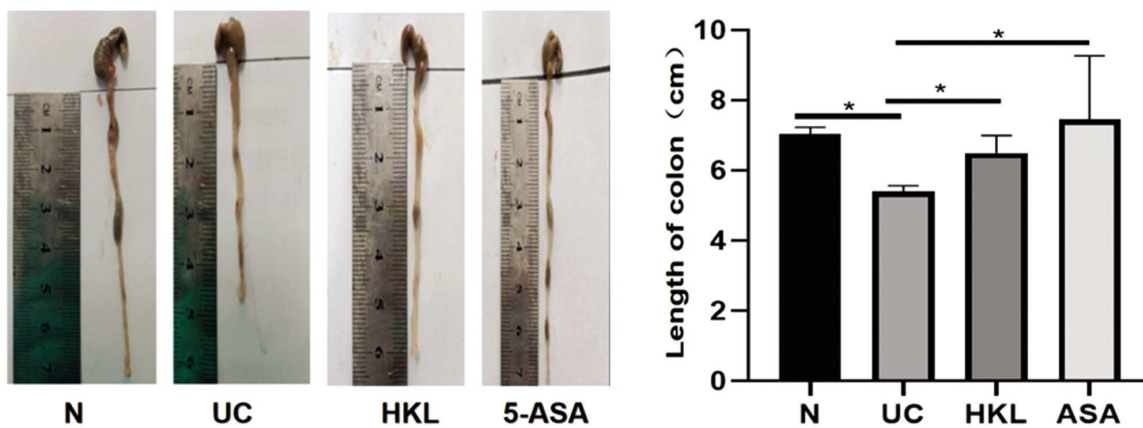


图1 各组小鼠结肠长度比较

Fig.1 Comparison of Colon Length in Different Groups of Mice

注: "*" 代表 $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ compared each two groups.

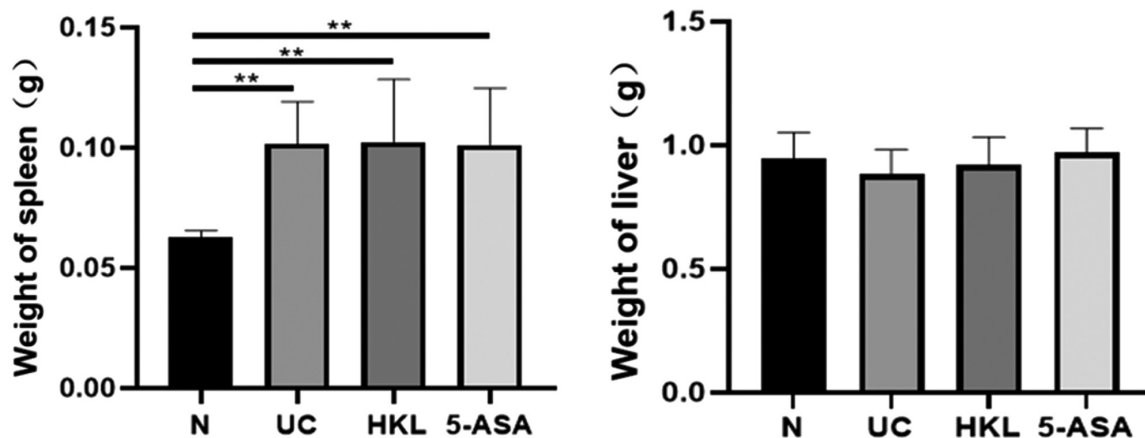


图2 各组小鼠肝脏和脾脏重量比较

Fig.2 Comparison of liver and spleen weights in each group of mice

注: "***" 代表 $P < 0.01$ 。

Note: ** $P < 0.01$ compared each two groups.

2.5 5-HT 信号通路相关蛋白的 mRNA 水平变化

RT-qPCR 结果显示(见图 6),与正常组相比,UC 组小鼠结肠组织中 SERT 的 mRNA 表达量有下调趋势,但组间无显著差异($P > 0.05$);与 UC 组相比,HKL 组和 5-ASA 组小鼠结肠组织中 SERT 的 mRNA 表达量显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);UC 组小鼠 TPH1 mRNA 表达量显著高于正常组($P < 0.01$)。而 HKL 和 5-ASA 干预后 UC 小鼠 TPH1 mRNA 表达量下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

近年来脑-肠轴的研究成为探究 UC 治疗的热门话题^[14]。研究发现,焦虑、抑郁症与 UC 发病密切相关,并且两者相互影响,具有协同作用^[15]。HPA 轴作为机体在遭受压力应激等刺激时的神经内分泌调控核心,应激时出现过度激活的情况。CORT 被认为是 HPA 轴激活的标志,异常激活的 HPA 轴会导致 CORT 的过量分泌,从而造成机体稳态失衡,促进病理进程,导致肠道炎症。当机体处于急性应激状态时,HPA 轴兴奋,ACTH 和 CORT 均上升,且其表达水平与创伤程度呈正相关^[16]。因此

UC 治疗过程中寻找能够修复局部损伤,同时对神经内分泌进行调控的药物可能更有利于 UC 的治疗并缓解 UC 的复发。

HKL 是由没食子、琥珀、车前草等十种中药材组成的复方药物,前期研究中已确认该药对 UC 有效^[17],但其疗效是否与对机体的神经内分泌调控具有一定的关系有待进一步研究。本文通过 HKL 对 HPA 轴和 5-HT 信号通路相关分子的影响探讨了 HKL 治疗 UC 的分子机制。研究结果显示,与正常组相比,UC 组小鼠血清中 ACTH 含量显著升高,CORT 含量上升趋势,说明 UC 组小鼠体内 HPA 轴处于激活的状态,其可能为 UC 小鼠肠道损伤及炎细胞浸润的原因之一。中药 HKL 进行干预后,小鼠血清中 ACTH 和 CORT 含量显著下降,说明 HKL 干预后的小鼠 CORT 水平正常,HPA 过度激活缓解。研究报道显示,在应激原的刺激下,下丘脑室旁核处的 CRH 以正反馈方式使自身分泌迅速增加。CRH 到达垂体后,与 CRFR1 结合,腺苷酸环化酶系统被激活,ACTH 被分泌入血,ACTH 受体被 ACTH 激活并产生应答^[18]。本研究中,UC 组小鼠 ACTH 和 CORT 含量升高,但 CRH 含量显著下降,可能原因为当外周的 ACTH 分泌浓度过高时,反馈性地抑制下丘脑的 CRH 分泌。而中药 HKL

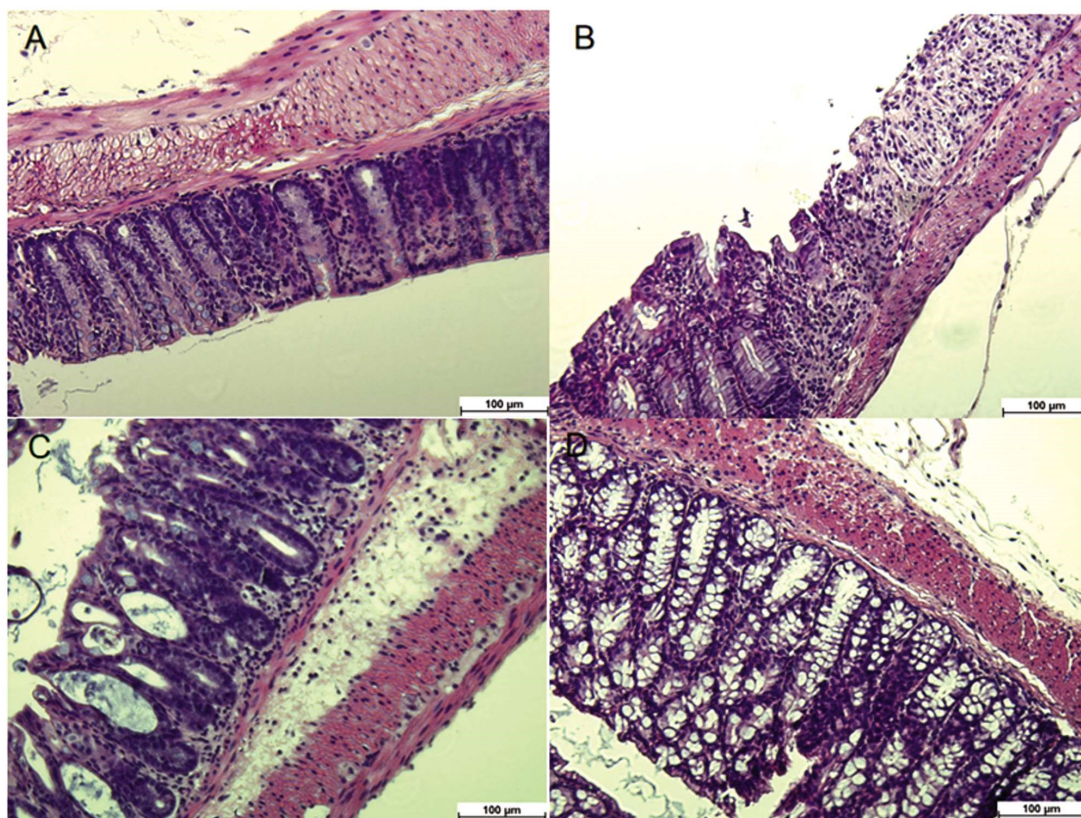


图3 各组小鼠结肠组织 HE 染色结果(x20)

Fig.3 HE staining results of colon tissue in each group of mice

A. Normal group; B. UC group; C. HKL group; D. 5-ASA group.

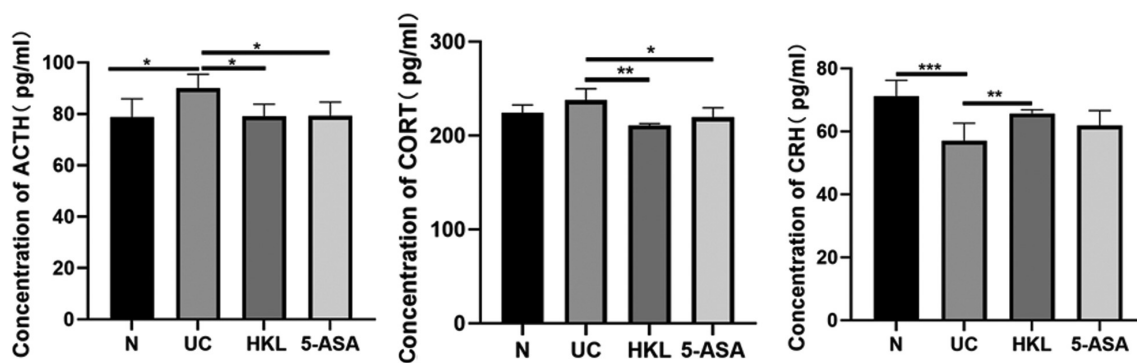


图4 各组小鼠 ACTH,CORT,CRH 的含量

Fig. 4 Changes in ACTH, CORT, and CRH content in each group of mice

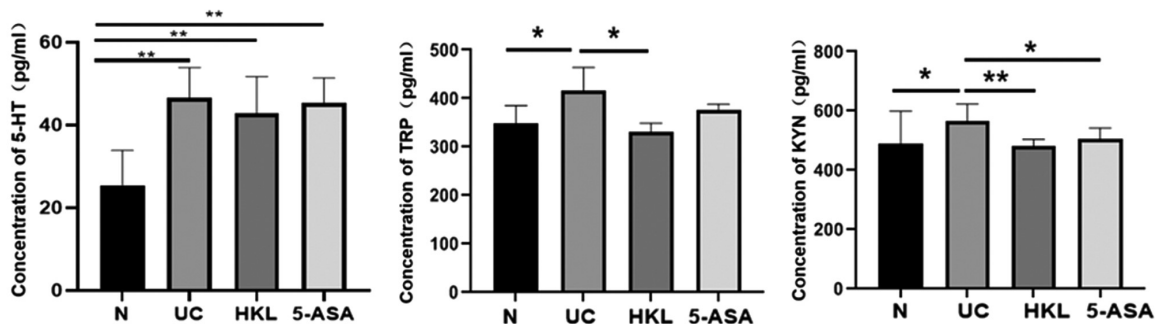
注: "*" 代表 $P<0.05$; "***" 代表 $P<0.001$, "****" 代表 $P<0.0001$ 。Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared each two groups.

图5 各组小鼠血清中 5-HT、TRP、KYN 的含量

Fig.5 The content of 5-HT, TRP, KYN in the serum of each group of mice

"*" 代表 $P<0.05$; "***" 代表 $P<0.001$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared each two groups.

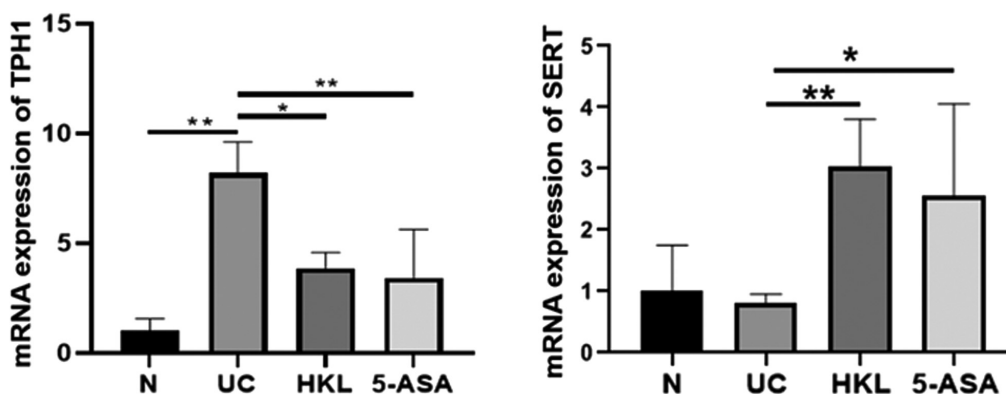


图6 各组小鼠结肠组织中 TPH1 和 SERT 的 mRNA 表达量

Fig.6 mRNA expression levels of TPH1 and SERT in colon tissue of mice in each group

"*" 代表 $P < 0.05$; "***" 代表 $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared each two groups.

干预后小鼠血清中 CRH 含量升高并且 ACTH、CORT、CRH 含量均接近于正常水平,初步说明中药 HKL 通过影响 HPA 轴,使机体稳态趋向于恢复平衡,有利于肠道炎症的抑制并促进溃疡的愈合。

5-HT 是一种单胺类脑肠肽,其广泛存在于神经系统和胃肠道系统,是脑肠轴的物质基础。UC 的结肠改变以溃疡性病变为特征,常伴有免疫细胞的明显浸润以及 5-HT 的改变。所以 5-HT 不仅可以调节胃肠道平滑肌收缩,从而影响胃肠道神经递质的释放,而且与 UC 的发生发展密切相关^[9]。本研究 ELISA 结果显示,与正常组相比,UC 组小鼠血清中的 5-HT 含量显著升高。已有研究发现,5-HT 的合成、释放、与受体结合及重摄取等信号传导过程中,任一环节发生异常均有可能导致肠道免疫的破坏、肠道菌群的紊乱、肠道动力的异常及精神心理的变化^[20,21]。说明 UC 组小鼠脾气暴躁、相互咬伤以及结肠组织病理变化等特点均与 5-HT 信号通路异常具有一定的关系。用中药 HKL 干预后小鼠血清中的 5-HT 含量下降,但与 UC 组差异不明显。因此本研究中进一步检测了 5-HT 的合成、释放、并重摄取相关基因的表达情况。

几项临床研究表明结肠黏膜 5-HT 释放量与 UC 疾病活动度呈正相关^[21,22],同时 IBD 患者肠道黏膜中 5-HT 的含量以及编码 5-HT 合成的限速酶色氨酸羟化酶 I (TPH-1)mRNA 的丰度发生了改变^[23,24]。肠道粘膜所释放的 5-HT 的细胞外利用率主要以上皮细胞,肠神经元和循环血小板上表达的 5-羟色胺转运蛋白(Serotonin transporter, SERT)有关,目前比较一致的结果为患者肠道黏膜上 SERT 的表达下降^[25-27]。本文通过 RT-qPCR 法检测各组小鼠结肠组织中 TPH1 和 SERT 的 mRNA 表达量。结果显示,与正常组小鼠相比,UC 组小鼠结肠组织中 TPH1 的 mRNA 表达量上调,SERT 的 mRNA 表达量有下调趋势,说明 UC 小鼠体内 5-HT 合成加速,但摄取受到障碍,导致肠道的高敏感性,从而促进 UC 的发展。而用 HKL 干预后,TPH1 的 mRNA 表达量下调,SERT 的 mRNA 表达量上调,5-HT 合成和摄取平衡开始恢复,有利于降低肠道敏感性以及溃疡的愈合。

另一方面,色氨酸(Tryptophane, Trp)除了通过 TPH-1 转化为 5-HT 外,还可通过限速酶吲哚胺 2,3-双加氧酶的作用分

解产生犬尿氨酸(Kynurenine, KYN)。KYN 进一步转化为烟酰胺衍生物和其他代谢产物,在免疫调节、细胞增殖和细胞能量生成中发挥作用。在 UC 期间检测 KYN 和 Trp 水平的研究结果显示,血清 Trp 含量降低,但血清 KYN 的变化是不一致的^[28-30],本研究结果显示,与正常组相比,UC 组小鼠血清中 KYN、TRP 含量显著升高。而与 UC 组相比,HKL 干预组小鼠血清中 KYN、TRP 含量显著降低,说明 UC 小鼠体内 5-HT 合成、摄取和分解代谢发生异常,中药 HKL 会影响 5-HT 信号通路中 TPH-I、SERT、KYN 和 Trp 等分子的产生或代谢。

综上所述,本文通过 DSS 动物模型初步确认中药 HKL 对过度活化的 HPA 轴具有一定的抑制作用,同时对 UC 所出现的 5-HT 信号通路相关分子的表达异常或代谢异常具有一定的调节作用,UC 发生发展过程中 HPA 轴和 5-HT 信号通路的相互作用关系和中药 HKL 对整体的调控机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Nakase H. Acute Severe Ulcerative Colitis: Optimal Strategies for Drug Therapy[J]. Gut Liver, 2023, 17(1): 49-57.
- [2] Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Intest Res, 2018, 16(1): 26-42.
- [3] 余蕾,武文志,张云桥,等. HPA 轴在抑郁症中的研究概述 [J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(02): 166-171.
- [4] Clarke G, Grenham S, Scully P, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner[J]. Mol Psychiatry, 2013, 18(6): 666-673.
- [5] Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats[J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 42: 207-217.
- [6] 胡莹,郑依玲,梅全喜,等. 痛泻要方破壁饮片对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽的影响[C]. 2021 第 26 届广东省药师周大会论文集, 2020: 674-683.
- [7] 罗运凤,高洁,柴艺汇,等. 痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠 SERT,肝脏 5-HT_{2A}R 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(02): 15-21.
- [8] 刘妹含. 肠道微生态失衡诱发大鼠抑郁样行为的作用机制及中药效应机理[D]. 北京中医药大学, 2020.

- [9] 蒋志滨,高洁,李文,等. 痛泻要方对TNBS诱导的肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠血清TNF- α 、5-HT及肝组织SCD1、5-HT₂受体mRNA表达的影响[J]. 中华中医药学, 2020, 38(03): 57-59+263.
- [10] He Y, Chen Z, Nie X, et al. Recent advances in polysaccharides from edible and medicinal *Polygonati rhizoma*: From bench to market[J]. Biol Macromol, 2022, 195: 102-116.
- [11] Liu Y, Li BG, Su YH, et al. Potential activity of Traditional Chinese Medicine against Ulcerative colitis: A review[J]. Ethnopharmacology, 2022, 289: 115084.
- [12] AXIMUJIANG K, KAHAMAN K, WUSHOUER X, et al. Lactobacillus acidophilus and HKL Suspension Alleviates Ulcerative Colitis in Rats by Regulating Gut Microbiota, Suppressing TLR9, and Promoting Metabolism[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 859628.
- [13] 库热西·玉努斯,张景萍,卡思木江·阿西木江. 一种治疗溃疡性结肠炎的中药组合物及其制备方法 ZL201810790421.7 [P]. 2020-12-01.
- [14] 梁国英,张爽,崔海栋,等. 基于脑肠轴理论浅析中医情志致溃疡性结肠炎的发病机制[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(12): 51-54.
- [15] 许冰,刘苗,石磊,等. 五音疗法联合揸针对轻中度溃疡性结肠炎伴轻度焦虑抑郁患者的干预效果 [J]. 北京中医药, 2023, 42(06): 700-702.
- [16] 李力,魏东,李水芹. 腹腔镜胆囊切除术和开腹手术对胆结石患者血清皮质醇、促肾上腺皮质激素及炎症因子水平的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15(05): 68-71.
- [17] 阿依加玛力·沙依提,卡思木江·阿西木江,许晨波,等. 复方缓溃乐混悬剂对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及机制[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(6): 616-623.
- [18] 马俊方,张予蜀,孔超美. 促肾上腺皮质激素释放因子在炎症性肠病中的研究进展[J]. 胃肠病学, 2013, 18(01): 52-54.
- [19] 麦伟,黄燕灵,黄海坤. 伊托必利联合乳果糖对便秘型肠易激综合征患5-HT、MOT及VIP表达水平的影响 [J]. 国际消化病杂志, 2019, 39(3): 89-92.
- [20] 任天华,吕敏敏,安晓萌,等. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜5-HT信号通路的变化特点[J]. 国际消化病杂志, 2019, 39(03): 222-227.
- [21] 毛若楠. 泄浊解毒方在治疗UC大鼠及预防UC大鼠复发中对TLR4、IL-10及5-HT的影响[D]. 河北中医学院, 2019.
- [22] Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome [J]. Gastroenterology, 2004, 126(7): 1657-1664.
- [23] Png C W, Sara K Lindén, Gilshenan K S, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria [J]. Gastroenterology, 2010, 105 (11): 2420-2428.
- [24] Kidd M, Gustafsson BI, Drozdov I, et al. IL1 β -and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(4): 439-450.
- [25] Tada Y, Ishihara S, Kawashima K, et al. Downregulation of serotonin reuptake transporter gene expression in healing colonic mucosa in presence of remaining low-grade inflammation in ulcerative colitis[J]. Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(8): 1443-1452.
- [26] Shajib MS, Chauhan U, Adeeb S, et al. Characterization of serotonin signaling components in patients with inflammatory bowel disease[J]. Can Assoc Gastroenterol, 2019, 2(3): 132-140.
- [27] Giuffrida P, Vanoli A, Biletta E, et al. Increase in chromogranin A and serotonin positive cells in pouch mucosa of patients with ulcerative colitis undergoing proctocolectomy [J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(11): 1205-1213.
- [28] Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, et al. Increased tryptophan metabolism is associated with activity of inflammatory bowel diseases [J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1504-1516.e2.
- [29] Dudziuska E, Szymona K, Kloc R, et al. Increased expression of kynurenine aminotransferases mRNA in lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease [J]. Therap Adv Gastroenterol, 2019, 12: 1756284819881304.
- [30] Sofia MA, Ciorba MA, Meckel K, et al. Tryptophan metabolism through the Kynurenine pathway is associated with endoscopic inflammation in ulcerative colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2018, 24 (7): 1471-1480.