

# 温补脾肾法对脾肾阳虚型 UC 大鼠结肠组织趋化因子信号通路的影响

殷银霞<sup>1</sup>, 刘永华<sup>2</sup>, 吴玉泓<sup>2</sup>, 谢守嫔<sup>5</sup>, 程小丽<sup>2</sup>, 田一虹<sup>2</sup>, 王园园<sup>2</sup>, 李海龙<sup>3,4\*</sup>

(1. 北京中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518116; 2. 甘肃中医药大学, 兰州 370000; 3. 甘肃中医药大学临床医学院, 兰州 730000; 4. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000; 5. 兰州市第一人民医院, 兰州 730000)

**【摘要】** 目的 寻找脾肾阳虚型 UC 的特异性靶点。方法 96 只 Wistar 大鼠随机分为模型组、高剂量组、中剂量组、低剂量组、SASP 组, 治疗组给予相应药物灌胃治疗。分别选取空白组大鼠结肠组织与模型组大鼠病变部位结肠组织进行高通量测序。RT-qPCR 法检测筛选的趋化因子的基因表达。结果 与模型组大鼠相比较, 根据  $q$ -value  $\leq 0.05$ , fold-change  $\geq 1.5$  筛选出空白组大鼠差异表达的基因。通过 GO 功能分类分析显示, 差异基因功能主要富集在生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 三个层面。通过差异基因 KEGG 富集分析发现趋化因子信号通路中 CXCL1、CXCL2、CXCR2、CXCL6、CCL7、CCL12 基因表达显著上调; 并通过 RT-qPCR 法验证, 以上因子的基因表达变化与测序结果一致, 经温补脾肾方药治疗后, 以上因子表达明显下调。结论 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎趋化因子信号通路中 CXCL1、CXCL2、CXCR2、CXCL6、CCL7、CCL12 基因表达显著上调, 可作为 UC 黏膜炎症活动的客观指标。具有温补脾肾作用的理中汤合四神丸复方中药颗粒可以有效下调以上因子的表达, 减缓炎症反应, 促进受损伤的结肠黏膜的修复。

**【关键词】** 溃疡性结肠炎; 特异性靶点; 第二代测序; 脾肾阳虚; 温补脾肾; 趋化因子

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 05-0610-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.012

## Effect of the warming and tonifying spleen-kidney method on chemokine signaling in colonic tissues of rats with spleen-kidney yang-deficiency

YIN Yinxia<sup>1</sup>, LIU Yonghua<sup>2</sup>, WU Yuhong<sup>1</sup>, XIE Shoupin<sup>5</sup>, CHENG Xiaoli<sup>2</sup>, TIAN Yihong<sup>2</sup>, WANG Yuanyuan<sup>1</sup>, LI Hailong<sup>3,4\*</sup>

(1. Shenzhen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen 518116, Guangdong, China. 2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 3. School of Clinical Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 4. Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation of Gansu Province, Key Laboratory of TCM Pharmacology and Toxicology in Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 5. The First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730000)

Corresponding author: LI Hailong. E-mail: 642101301@qq.com

**【Abstract】 Objective** To determine the specific targets for spleen-kidney yang-deficiency ulcerative colitis (UC). **Methods** Ninety-six Wistar rats were randomly divided into the model, high dose, middle dose, and low dose sulfasalazine (SASP) groups. Then, next-generation sequencing was performed on colon lesions from the blank and model

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (81260520); 甘肃省高等学校科研项目资助项目 (2016A-046)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81260520), and Scientific Research Project of Gansu University (2016A-046).

**【作者简介】** 殷银霞 (1968—), 女, 主任医师, 主要从事中医老年病及治则治法研究。Email: 2538283982@qq.com

**【通信作者】** 李海龙 (1975—), 男, 副教授, 博士, 主要从事中药药理与免疫研究。Email: 642101301@qq.com

groups. Real-time quantitative PCR was performed to detect the mRNA expression of screened chemokines. **Results** Compared with the model group, differentially expressed genes in the blank group were screened according to a *q*-value of 0.05 and fold-change of 1.5. According to Gene Ontology classification analysis, the differentially expressed genes mainly functioned in three pathways: biological process, cellular component, and molecular function. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis of the differentially expressed genes showed alterations in the chemokine signaling pathway, and real-time quantitative PCR confirmed that CXCL1, CXCL2, CXCR2, CXCL6, CCL7, CCL12, and CCL7 were significantly unregulated. Thus, the expression of the above factors was consistent with sequencing, and levels of these factors were decreased following treatment. **Conclusions** CCL12 expression was significantly unregulated along with the chemokine signaling pathway involving CXCL1, CXCL2, CXCR2, CXCL6, CCL7, and CCL12 in spleen-kidney yang-deficiency UC. Thus, this panel can be used as an objective index of inflammation for UC mucosa. Warming the spleen and kidney with Lizhong decoction and Sishen pills can effectively downregulate the expression of these factors, which restrained inflammatory reactions and promoted the repair of injured colonic mucosa.

**[ Keywords ]** ulcerative colitis; specific target; next-generation sequencing; spleen-kidney yang-deficiency; warming and tonifying spleen-kidney; chemokine

**Conflict of interest statement:** We declare that we have no conflict of interest statement.

溃疡性结肠炎是以腹痛、腹泻、里急后重及黏液脓血样便为主的常见炎症性肠病。前期研究表明<sup>[1]</sup>, 理中汤合四神丸中药复方颗粒可抑制 MyD88、IRAK1 的表达, 影响 MyD88 信号通路的传导, 达到治疗脾肾阳虚型 UC 的目的。在 UC 等炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 中, 肠道屏障受损, 肠上皮细胞 (intestinal epithelial cells, IECs) 表现出趋化因子的差异性表达<sup>[2-3]</sup>。有研究发现<sup>[4]</sup>, 在结肠炎结肠组织活检中的同一趋化因子组占总黏膜反应的主导地位, UC 组的表达更为明显。因此, 趋化因子在溃疡性结肠炎中起着重要作用。为进一步验证其在脾肾阳虚型 UC 发病机制中的调控作用, 本实验基于第二代测序技术筛选脾肾阳虚型 UC 的差异表达基因, 观察趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway) 中相关趋化因子的基因的表达变化情况, 从中寻找温补脾肾法中药治疗溃疡性结肠炎的特异性靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 96 只, 雌雄各半, 体重 (170 ± 20) g, 由甘肃中医药大学实验动物中心提供【SCXK(甘)2015-0002】, 饲养于实验中心 SPF 级环境内【SYXK(甘)2015-0005】。所有操作均符合实验动物伦理原则 (伦理审批号: 2015-079)。

#### 1.1.2 药物、试剂

大黄水煎液 (甘肃中医药大学附属医院中药房, 批号 20170306), 氢化可的松注射液 (国药集团

容生制药有限公司, 批号 1406418-A11), 三硝基苯磺酸 (Sigma 公司, 批号 SLBP08899 V), 柳氮磺胺吡啶肠溶片 (上海信谊制药公司, 批号 09141010), RNAiso PLUS 荧光定量试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号 0000231060), 理中汤合四神丸复方颗粒 (甘肃众友健康医药股份有限公司, 批号 20140721), 4% 多聚甲醛 (北京 Solarbio 公司, 批号 20160315), 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号 0000232248), CXCL1 基因上下游引物 (批号: CHPN132-05/CHPN132-06), CXCL2 基因上下游引物 (批号: CHPN132-07/CHPN132-08), CXCL6 基因上下游引物 (批号: CHPN132-03/CHPN132-04), CCL7 基因上下游引物 (批号: CHPN132-11/CHPN132-12), CCL12 基因上下游引物 (批号: CHPN132-13/CHPN132-14), CXCR2 基因上下游引物 (批号: CHPN132-01/CHPN132-02), 所有引物均由大连宝生物工程有限公司提供。

#### 1.1.3 实验设备

电子天平 (德国赛多利斯, CPA124S), 台式高速冷冻离心机 (凯达集团成员高科技公司, TGL16 M), 实时荧光定量 PCR (美国 Bio-rad 公司, CFX96), 高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备工程公司, CT14RD)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物实验

将 96 只 Wistar 大鼠雌雄各半分开按照随机数字表法分为空白组、模型组、高剂量组、中剂量组、低剂量组、SASP 组雌雄各 8 只 (造模成功后分组给药治疗模型组不给药)。本研究采用本课题组前期

的研究成果所建立的脾肾阳虚型 UC 病证结合模型制备方法<sup>[5]</sup>复制脾肾阳虚型 UC 大鼠模型。造模成功后,第 2 天开始灌胃给药,1 次/日,连续 21 d。根据体型系数,大鼠给药剂量换算为成人剂量之 10、5、2.5 倍,即高、中、低剂量给药剂量分别为 13.5、6.75、3.375 g/kg 的生药剂量,SASP 组为 0.2 g/kg,空白组、模型组给予等体积生理盐水灌胃,体积为 10 mL/kg。观察大鼠每天的精神、饮食、毛发色泽、大便秘结等情况,记录各组大鼠体重,1 次/周。模型组大鼠在造模 14 d 末、其他各组大鼠在用药 21 d 末,禁食 24 h,用水合氯醛麻醉后,打开腹腔,剪取 8 cm 结肠组织,沿纵轴剪开,用预冷的生理盐水冲洗干净,置于滤纸上吸干水分,根据 Strober 等<sup>[6]</sup>提出的大鼠结肠黏膜损伤评分标准,观察各组大鼠黏膜组织的充血、水肿、溃烂程度进行评分。留取病变的结肠组织,一部分用 4% 多聚甲醛溶液固定,常规 HE 染色后制作病理切片,另一部分用冻存管保存于 -80℃ 超低温冰箱,将用于后期检测。

### 1.2.2 病理切片的制备、观察

取出固定于 4% 多聚甲醛溶液中的病变结肠组织,石蜡包埋后制作病理切片,再进行 HE 染色。参照 Geboes 等<sup>[7]</sup>提出的评分标准,在光学显微镜下对切片进行观察评分。

### 1.2.3 高通量测序

分别选取空白组大鼠结肠组织与模型组大鼠病变部位结肠组织进行高通量测序,高通量测序以及基因差异表达分析、差异表达基因 GO 富集分析和 Pathway 富集分析由上海伯豪生物技术有限公司完成。根据  $q\text{-value} \leq 0.05$ ,  $\text{Fold-change} \geq 1.5$  的条件筛选差异基因。

### 1.2.4 Real Time-qPCR 法检测差异表达基因

常规提取 RNA,合成 cDNA。各基因的上下游引物序列、产物长度如表 1。扩增反应:总体积为 10  $\mu\text{L}$ ,预变性,PCR 反应循环 40 次,溶解,每个样本重复 4 孔,PCR 反应结束后分析熔解曲线,判断扩增产物是否有非特异性扩展;分析扩增曲线,得出 CT 值,按照相对定量法调用机器附带软件包计算相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件处理数据,计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,选用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),方差齐性 F 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

表 1 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences used for each gene		
引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Sequences	产物长度/bp Size/bp
CXCL1-F	TGCACCCAAACCGAAGTC	149
CXCL1-R	ACGCCATCGGTGCAATCTA	
CXCL2-F	TCATGAAGTTTGTCTCAACCCGTAA	191
CXCL2-R	AGACAGCGAGGCACATCAGGTA	
CXCL6-F	TGATCCCTGCAGGTCCACA	176
CXCL6-R	GGCTGATCTGACCAGTGCAA	
CCL7-F	GACCAATTCATCCACTTGTGTGCTA	152
CCL7-R	GATGGGCTTCAGCACAGACTTC	
CCL12-F	GAAGATCCACATTCGGAGGCTA	150
CCL12-R	TCCAAGTGGTTCATGGAGTCTTA	
CXCR2-F	AGAGACTTGGGAGCCACTCCAC	152
CXCR2-R	GGCGGGTCAGAACTGTAATTGTAA	

## 2 结果

### 2.1 一般生存情况

模型组大鼠普遍精神不佳、畏寒扎堆,进食量下降,毛发疏散、色泽枯槁,出现黏液、脓血大便,体重下降。空白组大鼠表现如常。各治疗组大鼠经治疗后普遍好转,精神转佳,反应灵活,活动增加,饮食增加,除个别大便偏软,其余基本成形,毛发出现光泽。(大鼠死亡情况:模型组 3 只,高剂量组 2 只,中剂量组 1 只,低剂量组 1 只,SASP 组 3 只)。

### 2.2 大鼠结肠黏膜组织形态学变化

#### 2.2.1 肉眼观察空白组与模型组大鼠结肠黏膜组织形态变化

模型组大鼠黏膜充血水肿、肠壁增厚,可见溃疡及糜烂。与正常的空白组大鼠结肠组织相比较,模型组大鼠结肠组织评分为 ( $4.67 \pm 0.58$ ),差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

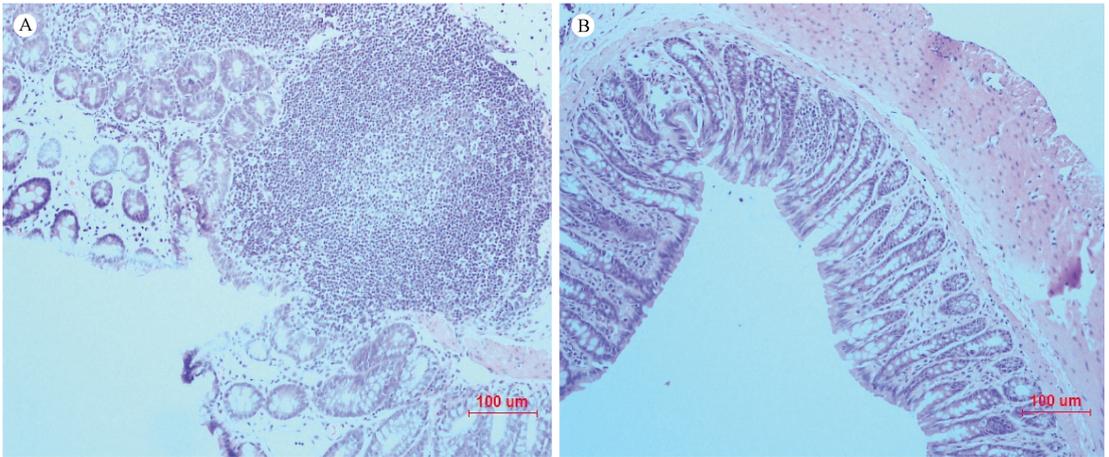
#### 2.2.2 光学显微镜下观察空白组与模型组大鼠结肠组织病理切片结果

模型组大鼠结肠组织可见黏膜层及黏膜下层有大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润,肌层见胶原纤维与成纤维细胞形成的肉芽组织,部分上皮组织脱落、坏死。空白组大鼠结肠组织黏膜层组织完整,可见黏膜表面的单直管状腺体,基本未见炎症细胞浸润。见图 1。

按照镜下大鼠结肠黏膜组织损伤评分标准进行评分,与空白组相比较,模型组大鼠评分为 ( $13.67 \pm 0.58$ ),差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 大鼠结肠组织样本总 RNA 质量控制

对送检的大鼠结肠组织样本进行检测发现,各



注:A) 模型组大鼠结肠组织病理切片结果;B) 空白组大鼠结肠组织病理切片结果。

图 1 病理切片结果

Note. A) Rat model group. B) Rat blank group.

Figure 1 pathological changes in the rat colon tissues

样本 RNA 在 18 s、28 s 处见明显峰值(见图 2),RIN (RNA 完整系数)  $\geq 6.0$  且  $28\text{ s}/18\text{ s} \geq 0.7$ ,说明 RNA 样本无真核或原核生物污染;无 DNA 或蛋白污染;无过多的 5 s rRNA。质检结果类别为 A1,符合电泳结果,总量达 2 次及以上,可进行后续实验。

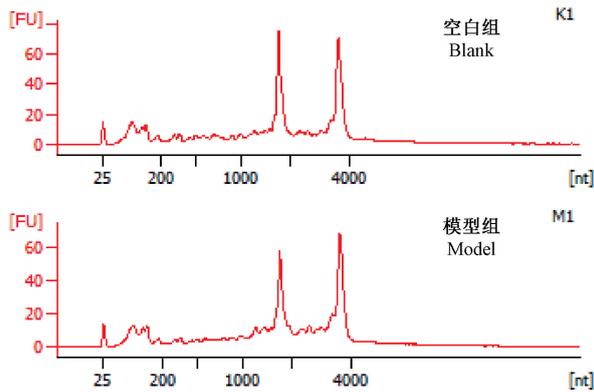


图 2 RNA 样本电泳图

Figure 2 RNA electropherogram

## 2.4 空白组大鼠与模型组大鼠相应结肠组织基因的差异性表达分析

根据高通量测序结果,与模型组大鼠相比较,根据  $q\text{-value} \leq 0.05$ ,  $\text{Fold-change} \geq 1.5$  筛选出空白组大鼠差异表达的基因 216 个,其中下调 166 个和上调 84 个。相对于模型组大鼠,表达下调的基因明显多于表达上调的基因,表达下调的基因数目是表达上调的 1.96 (166/84) 倍。两组之间的差异表达基因用火山图(见图 3),可以大致显示出差异表达

基因上调、下调的数量情况以及所占全部基因的比率。

## 2.5 差异表达基因的 GO 分析结果

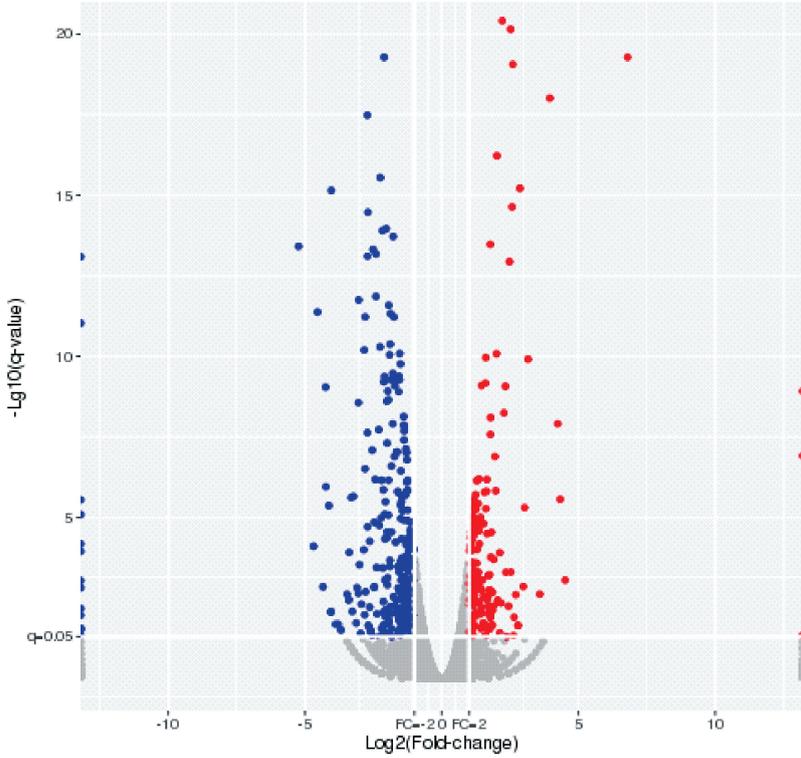
将筛选出来的差异表达基因进行生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 三个层次的统计分析,其中 BP 3158 个、CC 1863 个、MF 695 个,见图 4 所示。

## 2.6 差异表达基因 Pathway 分析结果

Pathway 分析结果显示,差异表达 mRNA 主要富集于细胞因子受体相互作用、吞噬小体、ECM-受体相互作用、TNF 信号通路、细胞粘附分子、脂肪细胞因子信号通路、抗原加工提呈、PI3K-Akt 信号通路、Jak-STAT 信号通路、肿瘤转录调控失调、炎症性肠疾病、MAPK 信号通路、细胞黏附、白细胞跨内皮迁移、错配修复、NF- $\kappa$ B 信号通路、Toll 样受体信号通路、Nod 样受体信号通路等炎症相关通路,见表 2。

## 2.7 大鼠结肠组织趋化因子 mRNA 的表达

RT-qPCR 法检测结果显示:与空白组结肠组织比较,模型组中 CXCL1、CXCL2、CXCR2、CXCL6、CCL7、CCL12 基因表达量明显提高,差异有显著性 ( $P < 0.01$ );与模型组结肠组织相比较,各治疗组中 CXCL1、CXCL2、CXCR2、CXCL6、CCL7、CCL12 基因表达量明显下降,差异有显著性 ( $P < 0.01$ );与测序结果一致。(见表 3)



注:红色表示上调差异基因,蓝色表示下调差异基因。

图 3 空白组与模型组大鼠结肠组织基因的差异性表达分析

Note. Red indicates upregulated genes, blue indicates downregulated genes.

Figure 3 Differentially expressed genes

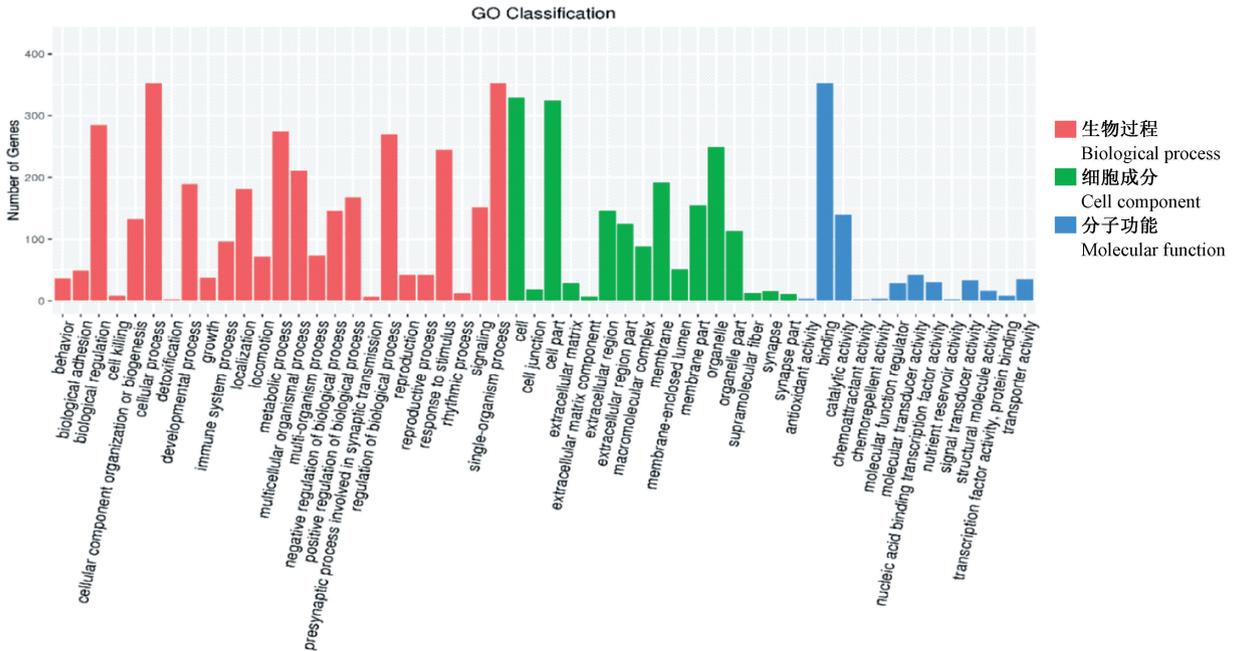


图 4 差异表达基因的 GO 功能分类统计图

Figure 4 Gene Ontology classifications of the differentially expressed genes

表 2 差异基因 KEGG 富集分析结果

Table 2 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis

信号通路 Pathways	基因数 Diff gene in this pathway	富集程度 rich_factor	P	Q-value
mo04060;Cytokine-cytokine receptor interaction	19	3.30	1.00E-05	7.27E-04
mo04145;Phagosome	11	2.57	3.89E-03	7.07E-02
mo04062;Chemokine signaling pathway	11	2.37	7.18E-03	8.24E-02
mo04514;Cell adhesion molecules (CAMs)	9	2.37	1.32E-02	1.25E-01
mo04512;ECM-receptor interaction	7	3.44	2.74E-03	6.65E-02
mo04668;TNF signaling pathway	7	2.44	2.02E-02	1.63E-01
mo03320;PPAR signaling pathway	6	2.99	1.01E-02	1.00E-01
mo04621;NOD-like receptor signaling pathway	4	2.67	3.89E-02	2.42E-01
mo04920;Adipocytokine signaling pathway	4	2.07	9.64E-02	4.29E-01
mo04620;Toll-like receptor signaling pathway	5	1.99	9.06E-02	4.11E-01
mo04612;Antigen processing and presentation	4	1.96	1.16E-01	4.86E-01
mo04151;PI3K-Akt signaling pathway	16	1.90	1.55E-02	1.30E-01
mo04630;Jak-STAT signaling pathway	7	1.79	9.79E-02	4.27E-01
mo05321;Inflammatory bowel disease (IBD)	3	1.78	1.87E-01	6.28E-01
mo05202;Transcriptional misregulation in cancer	7	1.66	1.36E-01	5.20E-01
mo04064;NF-kappa B signaling pathway	4	1.66	2.00E-01	6.52E-01
mo04670;Leukocyte transendothelial migration	5	1.65	1.80E-01	6.33E-01
mo04010;MAPK signaling pathway	11	1.65	8.80E-02	4.08E-01
mo04510;Focal adhesion	8	1.53	1.77E-01	6.33E-01

表 3 各组大鼠结肠组织相关趋化因子 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Relative expression of chemokines. ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别 Group	CXCL1	CXCL2	CXCR2
空白组 Blank	0.01048 ± 0.00031 <sup>△</sup>	0.00286 ± 0.00044 <sup>△</sup>	0.00146 ± 0.00034 <sup>△</sup>
模型组 Model	1.0 ± 0.03022	1.0 ± 0.08925	1.0 ± 0.0602
高剂量组 High dose	0.01874 ± 0.00271 <sup>△</sup>	0.00791 ± 0.0016 <sup>△</sup>	0.00406 ± 0.00161 <sup>△</sup>
中剂量组 Medium dose	0.03485 ± 0.00104 <sup>△</sup>	0.04511 ± 0.00331 <sup>△</sup>	0.0183 ± 0.00194 <sup>△</sup>
低剂量组 Low dose	0.0059 ± 0.00156 <sup>△</sup>	0.00342 ± 0.00009 <sup>△</sup>	0.00316 ± 0.00048 <sup>△</sup>
SASP 组 SASP	0.01518 ± 0.00109 <sup>△</sup>	0.00626 ± 0.00176 <sup>△</sup>	0.0147 ± 0.00139 <sup>△</sup>

组别 Group	CXCL6	CCL7	CCL12
空白组 Blank	0.02686 ± 0.0027 <sup>△</sup>	0.0443 ± 0.00134 <sup>△</sup>	0.03621 ± 0.00121 <sup>△</sup>
模型组 Modle Model	1.0 ± 0.07672	1.0 ± 0.05635	1.0 ± 0.09981
高剂量组 High dose	0.00742 ± 0.00104 <sup>△</sup>	0.03874 ± 0.00176 <sup>△</sup>	0.13348 ± 0.01406 <sup>△</sup>
中剂量组 Medium dose	0.07134 ± 0.00312 <sup>△</sup>	0.06134 ± 0.00339 <sup>△</sup>	0.15863 ± 0.00761 <sup>△</sup>
低剂量组 Low dose	0.01023 ± 0.0033 <sup>△</sup>	0.02 ± 0.00219 <sup>△</sup>	0.07744 ± 0.00697 <sup>△</sup>
SASP 组 SASP	0.0637 ± 0.0046 <sup>△</sup>	0.02405 ± 0.0007 <sup>△</sup>	0.09912 ± 0.00611 <sup>△</sup>

注:与模型组相比, <sup>△</sup>P < 0.01。

Note. Compared with the model group, <sup>△</sup>P < 0.01.

### 3 讨论

溃疡性结肠炎是发生于结肠黏膜组织的非特异性肠道炎症,其发病原因不明确。本研究应用第二代测序技术,通过比较空白组大鼠正常的结肠组织与模型组大鼠病变的结肠组织的基因表达差异,试图找到与溃疡性结肠炎发病机制相关的特异性基因,为中医药治疗 UC 的机制研究提供一定的理论依据。通过肉眼及电子显微镜下观察空白组大

鼠与模型组大鼠的结肠黏膜组织,根据病理学实验结果分析,可以初步认为模型复制成功。

对差异基因进行 GO 和 Pathway 功能富集分析结果显示,涉及的差异表达基因多与组织的损伤密切相关,其中趋化因子信号通路与 UC 炎症活动增强有直接的关系。趋化因子由内皮细胞产生,靶细胞表达的同源性趋化因子受体与之结合后被激活,进一步对循环白细胞发出信号,使白细胞整合素对内皮细胞粘附分子的亲和力增加,促使白细胞在组

组织间隙中聚集<sup>[8-9]</sup>。趋化因子能够粘附在细胞表面的糖胺聚糖上,使局部病灶的趋化剂浓度升高<sup>[10]</sup>。上皮细胞表达的趋化因子受体与趋化因子结合,具有定向迁移白细胞和淋巴细胞以及搬运造血干细胞的典型生物特征<sup>[11-12]</sup>,成为趋化因子信号通路的重要组成部分。

在本研究中脾肾阳虚型 UC 的大鼠结肠组织中仅发现了一种具有显著差异表达的趋化因子受体 CXCR2,它是否就是脾肾阳虚型 UC 的特异性靶点,有待进一步验证。Buanne 等<sup>[13]</sup>发现 CXCR2 基因敲除小鼠 UC 组织的炎症浸润明显减轻,临床症状亦明显减轻,证明 CXCR2 在结肠炎动物模型中起着关键的作用。CXCR2 抑制剂可以防止多形核白细胞的再循环和相关组织损伤,并进行了二期临床试验<sup>[14]</sup>,说明了 CXCR2 的高表达与组织的损伤具有明显的相关性。研究发现,在 CXCR2 基因敲除的小鼠中 CXCL1、CXCL2 不能被多形核白细胞迁移<sup>[15]</sup>。CXCL1、CXCL2、CXCL6 等作为 CXCR2 的特异性配体,在正常的人体与小鼠结肠组织中正常表达,在 UC 患者的黏膜中高表达<sup>[13, 16]</sup>。大量研究<sup>[17]</sup>已证实了 CXCL1 趋化中性粒细胞的性质。而中性粒细胞是抵御感染的关键,CXCL1 的表达能提高宿主防御和预防疾病的发生<sup>[18]</sup>。Shea-Donohue 等<sup>[19]</sup>研究发现,CXCL1 敲除小鼠的结肠炎症表现更严重,病理组织缺少中性粒细胞浸润。CXCL1 的过度表达可能与 UC 的严重程度相关。沈守荣等<sup>[20-21]</sup>研究发现,CXCL1 在 UC 小鼠模型多种细胞趋化因子水平中显著升高,并进一步应用 CXCL1 中和抗体治疗 UC 小鼠,有效缓解了 UC 的进展。

Han 等<sup>[22]</sup>研究发现,CXCL2 介导大鼠肠道炎症和损伤,通过阻断 CXCL2 可减少中性粒细胞浸润。Zahn 等<sup>[23]</sup>研究表明,CXCL2 可以作为检测 UC 黏膜炎症以及监测新药治疗效果的客观指标之一。Wuyts 等<sup>[24]</sup>研究证明,CXCL6 通过与 CXCR2 结合发挥作用,诱导白细胞趋化、促进血管新生成、免疫调节、抗菌等。在 UC 患者肠组织中发现,CXCL6 选择性表达于溃疡性的黏膜缺损区内皮细胞中<sup>[25]</sup>。炎症部位的单核细胞主要由 CCL7 调控迁移,炎症发生时,CCL7 呈现高表达<sup>[26-27]</sup>。在 IBD 患者身上,CCL7 等趋化因子主要参与巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的募集<sup>[28]</sup>。Ugucioni 等<sup>[29]</sup>研究证明,CCL7 在正常对照组与 UC 组结肠组织标本中均有表达,但在 UC 中表达明显上调。在慢性炎症

中,巨噬细胞分泌的 CCL12 表达上调,阻止修复性成纤维细胞的激活,延长炎症反应而不利于组织愈合<sup>[30]</sup>,这一特点可能是 UC 病程反复发作、迁延不愈的原因之一。

综上所述,在脾肾阳虚型 UC 中,以上趋化因子的表达具有一定特异性,同时也提示着疾病的发生发展过程是多种因子相互作用的结果。本研究得到了脾肾阳虚型 UC 差异表达的趋化因子基因序列,并应用 RT-qPCR 检测差异表达的趋化因子,检测结果与测序结果一致,说明本次测序结果可靠,进一步证明了该脾肾阳虚型 UC 大鼠病证结合模型具有可行性、合理性及科学性。CXCL2、CXCL1、CXCR2、CCL12、CXCL6、CCL7 等因子在脾肾阳虚型 UC 结肠组织中表达明显上调,且经中西药治疗后,各治疗组 CXCL1、CXCL2、CXCR2、CXCL6、CCL7、CCL12 基因表达量均显著下降。所以,本研究发现的这一系列趋化因子的差异性表达应可作为脾肾阳虚型 UC 的特异性靶点,并作为治疗效果及预后判断的指标。但是在脾肾阳虚型 UC 的发病过程中,这一系列趋化因子之间具体的相互作用及影响还不完全清楚,它们的差异表达是否完全体现出脾肾阳虚证的发病规律,仍有待进一步研究与验证。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] 刘香玉,刘永华,李海龙,等. 久泻灵颗粒对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠结肠髓样分化因子 88 和白细胞介素受体相关激酶 1 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(9): 51-54.  
Liu XY, Liu YH, Li HL, et al. Effect of Jiuxieling granule on the expression of colonic myeloid differentiation factor 88 and interleukin-1 receptor related kinase 1 in rats with ulcerative colitis with deficiency of spleen and kidney yang [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2017, 24(9): 51-54.
- [2] Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut[J]. Science, 2005, 307(5717): 1920-1925.
- [3] Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease[J]. J Clin Invest, 2007, 117(3): 514-521.
- [4] Puleston J, Cooper M, Murch S, et al. A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2005, 21(2): 109-120.
- [5] 吴玉泓,许雅清,李海龙,等. 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 116-119.  
Wu YH, Xu YQ, Li HL, et al. Establishment of rat model of spleen-kidney-yang-deficiency ulcerative colitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(2): 116-119.

- [ 6 ] Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2002,20:495-549.
- [ 7 ] Geboes K, Riddell R, Ost A, et al. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2000,47(3):404-409.
- [ 8 ] MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC. The central role of chemokines ( chemotactic cytokines ) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 1998, 4(1):54-67.
- [ 9 ] Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis[J]. *Science*, 1996,272(5258):60-66.
- [10] Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005,16(6):625-636.
- [11] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors[J]. *Pharmacol Rev*, 2000,52(1):145-176.
- [12] Rollins BJ. Chemokines[J]. *Blood*, 1997,90(3):909-928.
- [13] Buanne P, Di Carlo E, Caputi L, et al. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2007,82(5):1239-1246.
- [14] Allegretti M, Cesta MC, Garin A, et al. Current status of chemokine receptor inhibitors in development[J]. *Immunol Lett*, 2012,145(1-2):68-78.
- [15] Cacalano G, Lee J, Kikly K, et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog[J]. *Science*, 1994,265(5172):682-684.
- [16] Yang SK, Choi MS, Kim OH, et al. The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis; regulation by corticosteroids[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002,97(1):126-132.
- [17] Lira SA, Furtado GC. The biology of chemokines and their receptors[J]. *Immunol Res*, 2012,54(1-3):111-120.
- [18] Mehrad B, Wiekowski M, Morrison BE, et al. Transient lung-specific expression of the chemokine KC improves outcome in invasive aspergillosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(9):1263-1268.
- [19] Shea-Donohue T, Thomas K, Cody MJ, et al. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 ( KC/GRO-alpha ), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis[J]. *Innate Immun*, 2008,14(2):117-124.
- [20] Tang A, Li N, Li X, et al. Dynamic activation of the key pathways: linking colitis to colorectal cancer in a mouse model[J]. *Carcinogenesis*, 2012,33(7):1375-1383.
- [21] Luo L, Zhang X, Wang J, et al. Therapeutic effect of anti-CXCL1 neutralizing antibody on acute ulcerative colitis in mice[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2017,42(12):1375-1382.
- [22] Han XB, Liu X, Hsueh W, et al. Macrophage inflammatory protein-2 mediates the bowel injury induced by platelet-activating factor[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004,287(6):G1220-G1226.
- [23] Zahn A, Giese T, Kärner M, et al. Transcript levels of different cytokines and chemokines correlate with clinical and endoscopic activity in ulcerative colitis[J]. *BMC Gastroenterology*, 2009,9(1):1-7.
- [24] Wuyts A, Van Osselaer N, Haelens A, et al. Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties[J]. *Biochemistry*, 1997,36(9):2716-2723.
- [25] Gijssbers K, Van AG, Joossens S, et al. CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue[J]. *Eur J Immunol*, 2004,34(7):1992.
- [26] Dezerega A, Osorio C, Mardones J, et al. Monocyte chemotactic protein-3: possible involvement in apical periodontitis chemotaxis[J]. *Int Endod J*, 2010,43(10):902-908.
- [27] Santiago J, Hernandez-Cruz JL, Manjarrez-Zavala ME, et al. Role of monocyte chemotactic protein-3 and -4 in children with virus exacerbation of asthma[J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(5):1243-1249.
- [28] Gunaltay S, Kumawat AK, Nyhlin N, et al. Enhanced levels of chemokines and their receptors in the colon of microscopic colitis patients indicate mixed immune cell recruitment[J]. *Mediators Inflamm*, 2015,2015:132458.
- [29] Ugucioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, et al. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis[J]. *Am J Pathol*, 1999,155(2):331-336.
- [30] DeLeon-Pennell KY, Iyer RP, Ero OK, et al. Periodontal-induced chronic inflammation triggers macrophage secretion of Ccl12 to inhibit fibroblast-mediated cardiac wound healing[J]. *JCI Insight*, 2017,2(18):pii:94207.