

抗 C5aR 抗体联合大蒜素对诱发性 炎性肠病大鼠的治疗作用

周亚妮¹, 刘 丹²

(1. 商洛学院健康管理学院, 商洛 726000;

2. 西安市第五人民医院风湿免疫科, 西安 710061)

[摘要] 目的 探索抗补体 5a 受体(C5aR)抗体联合大蒜素对大鼠炎性肠病(IBD)的治疗作用。
方法 将 80 只经 2,4,6- 三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的 IBD 雄性大鼠随机分为 4 组: 模型对照组、抗 C5aR 抗体治疗组、大蒜素治疗组、抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组; 另 20 只雄性大鼠为正常对照组。药物灌胃前和灌胃后 14 d 统计大鼠体质量变化和生存率, 检测大鼠血清中白细胞介素 -6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平, 进行结肠组织大体观察以及病理学评分。
结果 抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组大鼠的体质量及生存率均高于其他治疗组, 且大鼠血清中炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平均呈明显回归趋势; 结肠组织病理学评分也表明联合治疗组的效果明显优于其他治疗组($P<0.05$)。
结论 抗 C5aR 抗体联合大蒜素是治疗 TNBS 诱导的大鼠 IBD 的有效方案, 其疗效优于单独使用抗 C5aR 抗体或者大蒜素。
[关键词] 抗 C5aR 抗体; 大蒜素; 炎性肠病; 2,4,6- 三硝基苯磺酸; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)04-0328-06

在 2,4,6- 三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎中, 炎症介质补体 5a (C5a)及细胞因子白细胞介素 -6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)与炎症反应程度存在线性相关, 抑制 C5a 可以降低 IL-6、TNF- α 的表达, 说明 C5a 在 TNBS 诱导的结肠炎发病机制中发挥着重要作用^[1-5]。抗 C5a 受体(C5aR)抗体属于 C5a 拮抗剂, 可抑制炎症介质 C5a 的活性, 减轻炎症反应。研究资料显示, 施用抗 C5aR 抗体, 可以提高 TNBS 诱导克罗恩模型大鼠的生存率, 减轻结肠水肿, 降低结肠和血清中一些炎症因子的水平, 增加动物进食量和体质量^[6]。

抗 C5aR 抗体目前已进入 II 期临床试验, 单

独使用对免疫系统有显著的抑制作用, 并且对肠黏膜有一定刺激性^[7-9]。大蒜属于一种日常食材, 研究表明, 在肠道感染中大蒜素不仅具有重要的抗菌效果, 而且对肠道黏膜有一定的修复作用^[10]。为了进一步探索对炎性肠病(IBD)的有效治疗方案, 作者以 TNBS 诱导的结肠炎大鼠为研究对象, 以 C5a、IL-6 在 IBD 炎症活动期表达增高为线索, 开展“抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗 IBD”实验, 分别使用抗 C5aR 抗体、大蒜素和抗 C5aR 抗体联合大蒜素三种不同药物方案对大鼠进行灌胃治疗, 为临床 IBD 的治疗和大蒜素的开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 100 只, 6~8 周龄, 体质量 180~220 g, 由西安交通大学医学院实验动

[收稿日期] 2019-01-21

[基金项目] 陕西省高等教育教学改革研究项目(19ZY022)

[作者简介] 周亚妮(1980—), 女, 副教授, 硕士。

E-mail: zhouyanyi1230@163.com

[通信作者] 刘 丹(1976—), 男, 博士, 主任医师, 从事临床免疫研究。E-mail: good-luck2006@163.com

物中心[SCXK(陕)K2018-0155]提供。动物饲养设施符合相关标准[SYXK(陕)K2017-0210], 实验计划通过医学院动物实验伦理委员会审查。

1.2 主要试剂和仪器

抗 C5aR 抗体购自上海吉尔生物化学有限公司(批号: 720120617F); 大蒜素注射液购自山东辰欣药业有限公司(批号: M15342Mm); IL-6 和 TNF- α 的 ELISA 试剂盒均购自北京城林生物有限公司; 紫外分光光度仪购自德国 Eppendorf 公司(型号: 1560VICTOR3); 酶标仪购自北京伯辉生物科技有限公司(型号: Model 680); 灌胃器购自山东科维器械有限公司(型号: 大鼠灌胃器 16#); 其他常规试剂及手术器械均由本实验室提供。

1.3 动物造模及分组处理

80 只大鼠以 TNBS 诱导法建立 IBD 模型^[11]。建模后第 1 日将 80 只 IBD 大鼠随机分成 4 组, 每组 20 只。(1) 模型对照组: 每日以 0.9% 生理盐水 2 mL 灌胃。(2) 抗 C5aR 抗体治疗组: 每日以 10 mg/kg 抗 C5aR 抗体灌胃。(3) 大蒜素治疗组: 每日以 10 mg/kg 大蒜素注射液灌胃。(4) 抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组: 每日以抗 C5aR 抗体和大蒜素混悬液同剂量灌胃。另 20 只大鼠为正常对照组, 未进行任何药物灌胃, 正常饲养。

每日灌胃 1 次, 固定每日 15:00 进行操作, 连续灌胃 2 周, 每次灌胃完毕后常规饲养, 每日观察大鼠活动、大便性状和死亡情况等, 如出现死亡即刻进行解剖。分别于灌胃后 2 d、3 d、7 d 和 14 d, 用配制的麻醉剂(0.4 mL/只)经腹腔注射麻醉大鼠, 进行固定后, 消毒, 经尾静脉采集血液 5~7 mL, 室温环境静置 1 h 后, 离心 5 min, 取上清液分装, 做标记, 保存于 -20 °C 低温冰箱, 待测。

1.4 麻醉剂的配制^[12]

将氯胺酮、速眠新和生理盐水按体积比 2:

1.5:3.5 配成混合溶液, 作为注射用麻醉剂, 于 4 °C 下保存备用。

1.5 大鼠体质量变化和生存率统计

各组大鼠于药物灌胃前和灌胃干预后 14 d (实验结束) 进行体质量和大鼠死亡数量的记录。

1.6 大鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平检测

从 -20 °C 低温冰箱内取出待测标本, 严格按照 ELISA 试剂盒说明进行 IL-6、TNF- α 检测。

1.7 结肠组织病理学评分

药物灌胃后 14 d, 用颈椎脱臼法处死所有大鼠, 剖腹并游离全结肠, 对其进行清洗处理, 观察肠道炎性损伤情况; 取病变明显处结肠组织一小段, 经体积分数 10% 甲醛溶液固定, HE 染色, 制成切片, 在光学显微镜下观察。参照有关评分标准^[13]进行结肠组织病理学评分。

1.8 统计分析

利用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布资料的组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠生存率及体质量

实验期间, 模型对照组大鼠死亡 4 只, 抗 C5aR 抗体治疗组和大蒜素治疗组大鼠死亡例数均为 2 只, 抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组和正常对照组大鼠无死亡(表 1)。

实验结束时, 模型对照组和大蒜素治疗组大鼠的体质量与治疗前几乎无明显变化, 抗 C5aR 抗体组较造模前体质量有所增长, 而抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组大鼠的体质量增长幅度较大, 正常对照组体质量稳定增长(表 1)。实验结束时模型对照组、抗 C5aR 抗体治疗组和大蒜素治疗组的大鼠体质量均明显低于抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组(均 $P < 0.05$)。

表 1 大鼠实验前后体质量变化

Table 1 Changes of body weight of rats before and after experiment

组 别	用药前体质量/g	实验结束体质量/g ($\bar{x} \pm s$)
模型对照组($n=16$) [#]	218 $\pm$ 15.69	217 $\pm$ 16.35 [*]
抗 C5aR 抗体治疗组($n=18$) [#]	218 $\pm$ 15.73	222 $\pm$ 13.65 [*]
大蒜素治疗组($n=18$) [#]	218 $\pm$ 15.54	218 $\pm$ 19.14 [*]
抗 C5aR 抗体 + 大蒜素治疗组($n=20$)	218 $\pm$ 15.34	230 $\pm$ 17.58
正常对照组($n=20$)	218 $\pm$ 15.52	232 $\pm$ 21.47

注: [#] 实验过程中这 3 组大鼠均有死亡。与抗 C5aR 抗体 + 大蒜素治疗组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

2.2 血清中 IL-6 和 TNF- α 分泌水平

由表 2、表 3 可以看出, 几乎每个时间段的模型对照组血清中 IL-6 和 TNF- α 水平都为最高值, 抗 C5aR 抗体治疗组和大蒜素治疗组 IL-6 水平居中, 抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组最低, 与模型对照组、抗 C5aR 抗体治疗组和大蒜素治疗组相比的差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.3 大鼠结肠形态观察

模型对照组 (图 1A) 大鼠结肠壁结构破坏

程度以及充血水肿最为明显, 表面的溃疡也非常严重; 抗 C5aR 抗体治疗组 (图 1C) 大鼠结肠的破坏情况较大蒜素治疗组 (图 1B) 明显减弱, 轻度充血, 有少许溃疡; 抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组 (图 1D) 大鼠结肠没有明显充血和溃疡, 与正常对照组 (图 1E) 较为接近, 说明抗 C5aR 抗体联合大蒜素灌胃治疗可以明显改善 TNBS 诱导的结肠炎大鼠肠道的破坏作用。

表 2 灌胃后不同时间大鼠血清 IL-6 水平

Table 2 Serum IL-6 in rats at different times after intragastric administration

组 别	治疗后时间/d			
	2	3	7	14
模型对照组	128.55 $\pm$ 13.05**	158.21 $\pm$ 26.88**	230.30 $\pm$ 40.50**	115.23 $\pm$ 11.40**
抗 C5aR 抗体治疗组	78.55 $\pm$ 10.29*	84.27 $\pm$ 12.20*	89.32 $\pm$ 14.14*	76.68 $\pm$ 7.52*
大蒜素治疗组	123.13 $\pm$ 12.24**	137.88 $\pm$ 10.32**	164.55 $\pm$ 23.47**	111.32 $\pm$ 12.81**
抗 C5aR 抗体+大蒜素治疗组	68.32 $\pm$ 10.07	72.68 $\pm$ 9.44	76.28 $\pm$ 9.57	66.53 $\pm$ 7.94
正常对照组	65.54 $\pm$ 6.82	66.32 $\pm$ 6.52	65.34 $\pm$ 6.80	65.56 $\pm$ 7.72

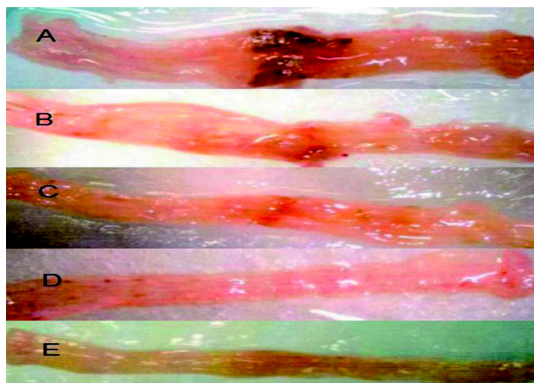
注: 与抗 C5aR 抗体 + 大蒜素治疗组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 3 灌胃后不同时间血清 TNF- α 水平

Table 3 Serum TNF- α in rats at different times after intragastric administration

组 别	治疗后时间/d			
	2	3	7	14
模型对照组	24.89 $\pm$ 2.92**	31.65 $\pm$ 3.01**	35.72 $\pm$ 3.09**	25.66 $\pm$ 2.74**
抗 C5aR 抗体治疗组	16.55 $\pm$ 1.29*	22.27 $\pm$ 1.20*	24.18 $\pm$ 2.52*	16.68 $\pm$ 1.02*
大蒜素治疗组	21.13 $\pm$ 2.24*	27.88 $\pm$ 2.32*	31.55 $\pm$ 3.07*	20.32 $\pm$ 2.81*
抗 C5aR 抗体+大蒜素治疗组	15.32 $\pm$ 1.07	19.68 $\pm$ 1.44	21.28 $\pm$ 1.57	12.53 $\pm$ 1.94
正常对照组	10.01 $\pm$ 0.69	10.05 $\pm$ 0.67	10.04 $\pm$ 0.78	10.10 $\pm$ 0.78

注: 与抗 C5aR 抗体 + 大蒜素治疗组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。



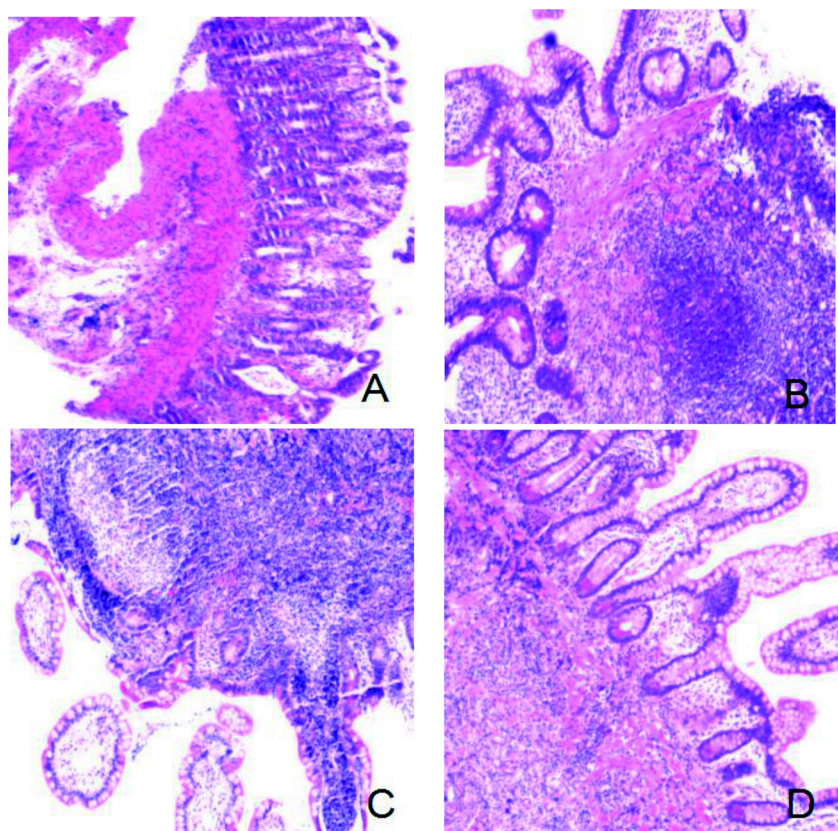
A 为模型对照组, B 为大蒜素治疗组, C 为抗 C5aR 抗体治疗组, D 为抗 C5aR 抗体 + 大蒜素治疗组, E 为正常对照组。

图 1 各组大鼠结肠形态观察

Figure 1 Observation of colon morphology of rats in each group

2.5 大鼠结肠组织病理学观察及评分

模型对照组大鼠结肠组织厚度增加较其余三组明显 (图 2A)。抗 C5aR 抗体治疗组 (图 2C) 的炎性反应程度较模型对照组减轻, 上皮组织修复效果较好, 主要以中性粒细胞和淋巴细胞浸润为主。大蒜素治疗组 (图 2B) 与抗 C5aR 抗体治疗组间差异不明显。抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组 (图 2D) 结肠组织结构清晰, 炎性明显减轻, 可见少量淋巴细胞浸润以及再生的上皮组织。各组大鼠病理学评分, 模型对照组最高, 抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组最低, 明显低于模型对照组、抗 C5aR 抗体治疗组和大蒜素治疗组 (均 $P < 0.05$, 表 4)。



A 为模型对照组, B 为大蒜素治疗组, C 为抗 C5aR 抗体治疗组, D 为抗 C5aR 抗体+大蒜素治疗组。

图 2 大鼠结肠组织病理学观察(HE, × 100)

Figure 2 Histopathological observation on colon in rats (HE, × 100)

表 4 大鼠结肠病理学评分

Table 4 Pathological score of colon in rats

组 别	n	评 分
模型对照组	16	4.36 ± 1.74**
大蒜素治疗组	18	2.92 ± 0.81*
抗 C5aR 抗体治疗组	18	2.76 ± 0.95*
抗 C5aR 抗体+大蒜素治疗组	20	1.97 ± 0.83
正常对照组	20	1.90 ± 0.78

注: 与抗 C5aR 抗体+大蒜素治疗组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

IBD 是一类病因未明的慢性胃肠道非特异性炎症。目前, 对于 IBD 发病机制的研究中, 较多人认为肠道内异常的免疫应答发挥着重要作用。抗 C5aR 抗体属于较为常见的免疫学制剂用药, 对于抑制 IBD 的炎症反应起到较好的治疗效

果, 而单一用药的副作用报道较多^[14-15]。大蒜素是从大蒜中提取出来的有效成分, 具有广谱的抑菌、抗病毒以及抗真菌作用。另外, 大蒜素对机体免疫功能的调节以及抑制炎症因子的分泌等也发挥着重要作用^[9]。近年来, 大蒜素在肠道炎症反应中的治疗作用倍受重视。

研究表明, IBD 的发生与肠道内异常的免疫活动密切相关, 而炎症因子的分泌水平在一定程度上能够反映病情的轻重程度^[16-18]。IL-6、TNF- α 属于重要的炎症因子, 其表达与炎症反应程度有一致性。动物实验及临床研究显示, 血清中 IL-6、TNF- α 作为一种炎症介质, 在一定程度上能够反映 IBD 炎症活动程度, 炎症反应缓解, IL-6、TNF- α 的水平随之降低^[19-22]。本实验通过检测大鼠血清中 IL-6、TNF- α 的水平了解结肠炎炎症反应程度, 从而评估三种用药方案的治疗效果。结果表明抗 C5aR 抗体联合大蒜素抑制 IBD 炎

性反应效果最佳。对三个治疗组进行病理学评分结果分析, 也发现抗 C5aR 抗体联合大蒜素抑制 IBD 炎性反应的疗效最佳。由结肠形态观察和病理切片比较, 联合用药灌胃组结肠炎性反应最轻, 可见再生的上皮组织, 固有层有少量淋巴细胞浸润, 说明抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗可以明显改善 TNBS 诱导的结肠炎对肠道的破坏。对各组大鼠的生存率和体质量变化分别进行统计分析, 发现抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组大鼠生存率高于其余各组; 同样, 抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗组大鼠的体质量与实验前体质量最接近, 说明抗 C5aR 抗体联合大蒜素治疗对于恢复 IBD 大鼠体质量优于大蒜素治疗组或抗 C5aR 抗体治疗组。

总之, 本实验以 TNBS 诱导的大鼠结肠炎为研究基础, 应用不同药物对大鼠灌胃干预, 通过大鼠生存率比较、体质量变化、结肠组织形态观察、组织病理学评分以及血清中 IL-6、TNF- α 分泌水平等进行分析, 得出结论: 抗 C5aR 抗体联合大蒜素是治疗 TNBS 诱导性结肠炎的有效方案, 其疗效优于单独使用抗 C5aR 抗体或者大蒜素, 并可以提高动物的生存率。本研究为临床 IBD 的治疗提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] 高娟. TNF- α 抑制剂在炎症性肠病治疗中的应用[J]. 转化医学电子杂志, 2016, 3(7):90-91.
- [2] Xiao B, Laroui H, Ayyadurai S, et al. Mannosylated bioreducible nanoparticle mediated macrophage-specific TNF- α RNA interference for IBD therapy[J]. Biomaterials, 2013, 34(30):7471-7482.
- [3] Yin B, Hu X, Wang J, et al. Blocking TNF- α by combination of TNF- α and TNFR-binding cyclic peptide ameliorates the severity of TNBS-induced colitis in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 656(3):119-124.
- [4] 唐齐林, 王为, 周国华. TNF- α 、IL-6 在炎症性肠病发病机制中的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(7):1174-1176.
- [5] 梁皓天, 宋静荣. TNF- α 、IL-6、IL-8 水平与溃疡性结肠炎相关性研究[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(21):92-93.
- [6] Moko P, Kawalec P, Pilc A. Safety profile of biologic drugs in the therapy of ulcerative colitis: A systematic review and network meta-analysis[J]. Pharmacotherapy, 2016, 36(8):870-879.
- [7] 杨永涛, 汪正清. 补体抑制剂研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(24):2093-2097.
- [8] 王会会, 陈国江, 杨跃梅, 等. 补体 C5a 受体拮抗剂体外筛选平台建立[J]. 国际药学杂志, 2011, 38(1): 62-67.
- [9] 陈月, 吕凤林. 补体 C5a 新型抑制剂研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(2):180-184.
- [10] 张晓云, 许博文, 全乐, 等. 蒜素抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 华北理工大学学报(医学版), 2017, 19(2): 165-168.
- [11] 马艳, 张敬涛, 白克运. 炎症性肠病小鼠模型研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(4):447-451.
- [12] 徐小班, 梁向南, 殷艺娜. 孕期小鼠氯胺酮多次暴露对子代鼠小胶质细胞及成年后学习记忆功能的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(4):340-343.
- [13] 朱芸, 周晓军. 炎症性肠病的临床病理诊断[J]. 诊断病理学杂志, 2010, 17(6):465-467.
- [14] 陈忱, 吕若芸. C5a 在炎症反应中的作用及其抗体药物的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(5):547-552.
- [15] 杨帆, 李东风, 徐书雯. C5a 及其受体拮抗剂在 A β 1-42 处理的 BV2 细胞 TNF- α 和 CD88 表达中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(3):265-268.
- [16] 姚静文, 赵景鹏, 王德才. 大蒜素的生物学活性及应用研究现状[J]. 泰山医学院学报, 2017, 38(5): 597-600.
- [17] Li XH, Li CY, Lu JM, et al. Allicin ameliorates cognitive deficits ageing-induced learning and memory deficits through enhancing of Nrf2 antioxidant signaling pathways[J]. Neurosci Lett, 2012, 514:46-50.
- [18] Cha JH, Choi YJ, Cha SH, et al. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis in U87MG human glioblastoma cells through an ERK-dependent pathway[J]. Oncol Rep, 2012, 28:41-48.
- [19] 蔚晓霞, 刘占举, 胡艺等. 炎症性肠病患者的肠道菌群分布与血清 TNF- α 与 IL-6 水平的相关性[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(16):3076-3078.
- [20] Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5):1310-1316.
- [21] 陈红宇, 刘亚军, 沈洪. 炎症性肠病患者血清 IL-6、SICAM-1 及 Chemerin 的检测及临床价值[J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(3):289-295.
- [22] 周亚妮, 李可, 刘丹. 基于 CLP 败血症小鼠中补体 C5a 与白细胞介素-6 相关性研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2017, 42(2):148-150.

Therapeutic Effect of Anti-complement 5a Receptor Antibody Combined with Allicin on Induced Inflammatory Bowel Disease In Rats

ZHOU Yani¹, LIU Dan²

(1. Health Management School of Shangluo University,

Shangluo 726000, Shaanxi Province China;

2. Department of Rheumatology and Immunology,

Fifth People's Hospital of Xi'an, Xi'an 710061, China)

[Abstract] Objective To explore the therapeutic effect of anti-complement 5a receptor (anti-C5aR) antibody combined with allicin on inflammatory bowel disease (IBD) in rats. **Methods** Eighty IBD male rats induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid sol (TNBS) were randomly divided into 4 groups: model control group, anti-C5aR antibody treatment group, allicin treatment group and anti-C5aR antibody combined with allicin treatment group, another 20 normal male rats were used as the normal control group. The changes in body weight and survival rate, serum interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) levels, colonic tissue gross observation and pathological score were measured before and 14 d after drug intragastric administration. **Results** The body weight and survival rate of the rats treated with anti-C5aR antibody combined with allicin were higher than those of other treatment groups, and the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in the serum of the rats treated with the combination of anti-C5aR antibody and allicin showed a significant regression trend with the time. The histopathological score of the colon also suggested that anti-C5aR antibody combined with allicin had the best effect ($P < 0.05$) in the treatment of IBD. **Conclusion** Anti-C5aR antibody combined with allicin is an effective treatment for TNBS-induced colitis, and its efficacy is better than anti-C5aR antibody or allicin alone.

[Key words] Anti-C5aR antibody; Allicin; Inflammatory bowel disease; 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid sol; Rats