

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.03.014

黄芪-败酱草药对对 HT-29 细胞炎症模型 JAK1/STAT6/SOCS1 信号通路的影响

孙大娟¹, 魏秀楠², 程艳¹, 迟莉丽¹✉

1. 山东中医药大学附属医院, 山东省济南市历下区经十路 16369 号, 250014; 2. 山东中医药大学



[摘要] **目的** 探讨黄芪-败酱草药对治疗溃疡性结肠炎(UC)的可能作用机制。**方法** 脂多糖(LPS) 20 μg/ml 干预 HT-29 细胞 24 h, 诱导建立炎症细胞模型。采用 8 个不同浓度 (1.125、2.25、4.5、9、18、36、72、144 mg/ml) 黄芪-败酱草干预炎症细胞模型 24 h, CCK-8 法检测细胞活力, 选取细胞活力最高的 3 个黄芪-败酱草浓度用于后续实验。实验分为空白组、模型组、美沙拉嗪组及黄芪-败酱草低、中、高剂量组 6 组。除空白组外, 其余各组细胞建立炎症模型后, 美沙拉嗪组加入 1 mg/ml 的 5-氨基水杨酸 100 μl, 黄芪-败酱草低、中、高剂量组分别加入筛选浓度的低、中、高浓度黄芪-败酱草 100 μl, 空白组、模型组均加入 100 μl 完全培养基, 干预 24 h。ELISA 法检测炎症因子白细胞介素 13 (IL-13)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 18 (IL-18)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 1β (IL-1β) 表达; Western blot 法检测咬合蛋白 (Occludin)、紧密连接蛋白 1 (Claudin-1)、磷酸化蛋白质酪氨酸激酶 1 (p-JAK1)、磷酸化信号转导和转录激活因子 6 (p-STAT6)、蛋白质酪氨酸激酶 1 (JAK1)、信号转导和转录激活因子 6 (STAT6)、细胞因子信号传导抑制蛋白 1 (SOCS1) 蛋白表达, qRT-PCR 法检测 JAK1、STAT6、SOCS1 mRNA 表达。**结果** 最终选择黄芪-败酱草浓度 2.25、4.5、9 mg/ml 作为低、中、高浓度进行后续实验。与模型组比较, 黄芪-败酱草高剂量组和美沙拉嗪组 IL-6、IL-1β、IL-18、TNF-α 表达减少, IL-13 表达增多, Occludin、Claudin-1、SOCS1 蛋白表达及 SOCS1 mRNA 表达上调, p-JAK1、p-STAT6 蛋白表达及 JAK1、STAT6 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与美沙拉嗪组比较, 黄芪-败酱草高剂量组 IL-6、IL-1β、TNF-α 升高, IL-13 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Occludin、Claudin-1 蛋白表达, JAK1、STAT6、SOCS1 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 黄芪-败酱草药对可能通过 JAK1/STAT6/SOCS1 通路下调致炎因子表达, 从而发挥抗炎、修复溃疡性结肠炎肠黏膜屏障作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 黄芪; 败酱草; 炎症因子; 肠黏膜屏障; JAK1/STAT6/SOCS1 通路

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种反复发作的慢性炎症性肠病, 治愈率低、复发率高, 且随着累积炎症负荷的增加, 部分 UC 通过“慢性炎症反应-低度/高度异型增生-癌变”过程发展为结肠炎相关性结肠癌^[1]。肠黏膜屏障在 UC 发病中具有重要作用^[2]。前期研究发现, 安肠愈疡汤具有扶正补虚、解毒安肠功效, 可改善 UC 大鼠肠黏膜屏障功能^[3]。鉴于中药复方成分复杂、靶点众多, 存在作用机制不明确等问题, 为优化处方, 找

出功效核心, 课题组结合前期中药复方数据挖掘结果^[4-6], 提取出黄芪-败酱草药对精简复方。本实验在前期研究基础上, 模拟体内 UC 炎症微环境, 建立脂多糖 (LPS) 诱导的 HT-29 炎症细胞模型, 观察黄芪-败酱草药对对 HT-29 炎症细胞模型的影响, 并探讨其可能的作用机制, 以期研发治疗 UC 的有效药物提供证据。

1 材料

1.1 细胞

人结直肠腺癌细胞 HT-29 (货号: ZQ0057), 上海中桥新舟生物科技有限公司。

基金项目: 国家自然科学基金 (81673969, 82205057)

✉ 通讯作者: chililiyl@163.com

1.2 药物

黄芪 30 g (批号: 2012260042), 安徽亳州市沪谯药业有限公司; 北败酱草 30 g (批号: 200402), 山东百味堂中药饮片有限公司。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 北败酱草为菊科植物苣荬菜 *Sonchus arvensis* L. 的干燥幼苗。黄芪-败酱草浸膏由山东中医药大学附属医院药剂科制备及质量控制。浸膏称量后完全溶解于 RPMI 1640 培养基中, 通过 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 制成无菌药品溶液, 再配置成相应浓度的药液, 现配现用。5-氨基水杨酸 (5-ASA) 标准品 (美沙拉嗪, 货号: SA5260), 北京索莱宝科技有限公司。称取适量上述药品, 于二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 用旋涡震荡仪震荡混匀, 制置较高浓度的母液, 取适量母液, 在 RPMI 1640 培养基中完全溶解, 用 0.22 μm 滤膜除菌后制成无菌药品溶液, 然后将其配置为相应的浓度药液。

1.3 主要试剂

LPS [批号: abs47014848, 爱必信 (上海) 生物科技有限公司]; 增强型 CCK-8 试剂盒 (批号: BA00208), 人类白细胞介素 13 (IL-13, 批号: bsk11003)、白细胞介素 6 (IL-6, 批号: bsk11007)、白细胞介素 18 (IL-18, 批号: bsk11056)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号: bsk11014) ELISA 试剂盒, 磷酸化信号转导和转录激活因子 6 (p-STAT6) 抗体 (批号: bs-1791R), 细胞因子信号传导抑制蛋白 1 (SOCS1) 抗体 (批号: bs-23696R), 信号转导和转录激活因子 6 (STAT6) 抗体 (批号: bs-1143R), 蛋白质酪氨酸激酶 1 (JAK1) 兔多克隆抗体 (批号: bs-1439R), 咬合蛋白 (Occludin) 兔多克隆抗体 (批号: bs-10011R), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: PC0020), RIPA 裂解液 (批号: C5029), 均购于北京博奥森生物技术有限公司; 紧密连接蛋白 1 (Claudin-1) 兔单克隆抗体 (批号: ab180158, 英国 Abcam 公司); SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (货号: AADLN, 山东思科捷生物技术有限公司); RNAiso Plus 提取试剂盒 (批号: 9108, 日本 Takara 公司); Evo M-MLV 反转录试剂预混液 (批号: AG11706)、SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (批号: AG11701), 湖南艾科瑞生物工程有限公司; 人类白细胞介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号: SEKH-0002, 北京索莱宝科技有限公司); 磷酸化

蛋白质酪氨酸激酶 1 (p-JAK1) 兔多克隆抗体 (批号: AF2012, 江苏亲科生物研究中心); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 [批号: (5X) P0015, 上海碧云天生物科技有限公司]; GAPDH (批号: af1186, 上海碧泰生物技术研究所以)。

1.4 主要仪器

INC153med 型 CO₂ 培养箱 (德国 Memmert 公司); Axiovert 40 型倒置相差显微镜 (德国 Zeiss 公司); Multiskan GO1510 型全波长酶标仪、ST8 型低速自动平衡离心机、冷冻高速离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱、SIM-F124 型制冰机 (日本 SANYO 公司); FluorChem Q 型蛋白印迹成像和定量分析系统 (美国 Protein-simple 公司); PowerPac 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 480 II 型 PCR 仪 (德国 Roche 公司); Amer-sham Imager600 型全自动化学发光图像分析系统 (美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 细胞炎症模型构建

HT-29 结直肠癌细胞株是研究 UC 炎症模型的常用细胞之一, 其可靠性已经过反复验证^[7-8]。参照文献[9]采用 LPS 干预 HT-29 细胞构建体外炎症模型。依据课题组前期实验结果^[10], 选取 LPS 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为体外诱导建立细胞炎症模型的药物浓度。HT-29 细胞复苏、传代, 用完全培养基制备单细胞悬液, 细胞密度为 5000/孔接种到 96 孔板, 孔内终体积 100 μl ; 待细胞贴壁后, 吸弃旧培养基, 向每个孔中加入完全培养基稀释的 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LPS 干预 24 h, 以未经 LPS 处理的细胞作为空白组。炎症细胞模型见附图 1 (扫描本文二维码获取)。

2.2 黄芪-败酱草实验药物浓度的筛选

黄芪-败酱草组设 1.125、2.25、4.5、9、18、36、72、144 mg/ml 8 个浓度梯度, 另设正常未处理 HT-29 细胞为空白对照组, 不加药干预的炎症模型细胞为模型对照组。不同浓度黄芪-败酱草干预炎症细胞模型 24 h 后, CCK-8 法检测细胞活力。HT-29 细胞 5000/孔接种到 96 孔板, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LPS 干预 24 h 后, 吸弃旧培养基, 每孔加入含不同浓度黄芪-败酱草药液的完全培养基 100 μl 。干预 24 h 后每孔加入完全培养基 100 μl 及 CCK-8 10 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5%CO₂ 细胞培养箱内继续孵育 2 h, 终止培养。使用酶标仪选择 490 nm 波长测各孔光吸收值, 即为细胞活力。选取细胞活力最高的

3 个黄芪-败酱草浓度用于后续实验。每组设 6 个复孔，实验重复 3 次。

2.3 实验分组及干预方法

实验分为空白组、模型组、美沙拉嗪组及黄芪-败酱草低、中、高剂量组 6 组，正常未处理 HT-29 细胞设为空白组。其余组均为炎症模型细胞。依据前期实验结果^[11]，美沙拉嗪组加入含 1 mg/ml 的 5-氨基水杨酸完全培养基 100 μ l，黄芪-败酱草低、中、高剂量组分别加入含筛选浓度的黄芪-败酱草药液完全培养基 100 μ l，空白组、模型组均加入 100 μ l 完全培养基，每组设 6 个复孔，干预 24 h，实验重复 3 次。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 ELISA 法检测炎症因子含量 干预 24 h 后，收集细胞上清，4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 20 min（离心半径 13.5 cm），检测各组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IL-13 表达水平，参照试剂盒说明书操作。

2.4.2 Western blot 法检测 Occludin、Claudin-1、p-JAK1、p-STAT6、JAK1、STAT6、SOCS1 蛋白表达 干预 24 h 后，收集细胞，加入含 1% PMSF 的 RIPA 细胞裂解液裂解细胞，取上清液，BCA 蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度后-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。取含有 50 μ g 的蛋白溶液为上样量，依次经电泳、转膜、封闭后，再分别加入结合一抗（1：1000）、二抗（1：5000），后再分别洗膜，避光显色 2 min，最后在全自动化学发光图像分析系统中进行扫描。量化标准为目标蛋白灰度值与标准蛋白灰度值之比。以 GAPDH 为内参，Image J 1.8.0 软件分析灰度值，计算蛋白相对表达。每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。

2.4.3 qRT-PCR 检测 JAK1、STAT6、SOCS1 mRNA 表达 干预 24 h 后，参照 RNAiso Plus 说明书采用 RNAiso Plus 提取总 RNA，逆转录（37 $^{\circ}$ C 15 min，85 $^{\circ}$ C 5 s，4 $^{\circ}$ C）为 cDNA，进行荧光定量 PCR 反应（95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，65 $^{\circ}$ C 退火 10 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s，共 45 个循环），以 β -actin 作为内参，计算样本中目的基因相对表达量。以空白组 mRNA 表达量为 1，采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算组间对应基因的表达差异。每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。引物序列见表 1，引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2.5 统计学方法

应用 Graphpad Prism 8 软件进行数据处理。计

量资料均符合正态分布，用均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。满足方差齐性者，采用单因素方差分析方法，组间比较使用 Turkey's 多重对比检验；对于不满足方差齐性的指标，采用 Welch's ANOVA 方法，组间比较采用 Games-Howell's 多次序检验。相关性分析采用 Pearson 线性相关。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因		序列（5'-3'）	产物长度 /bp
JAK1	正向	CCACTACCGGATGAGGTTCTA	213
	反向	GGGTCTCGAATAGGAGCCAG	213
STAT6	正向	CGACTAGGGGAGATCCACCTT	92
	反向	GCAGGAGTTTCTATCAAGCTGTG	92
SOCS1	正向	CACGCACTTCCGCACATTC	191
	反向	TAAGGGCGAAAAAGCAGTTCC	191
β -actin	正向	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	171
	反向	ATGGAGCCACCGATCCACA	171

注：JAK1，蛋白质酪氨酸激酶；STAT6，信号转导和转录激活因子 6；SOCS1，细胞因子信号传导抑制蛋白 1。

3 结果

3.1 模型评价

表 2 示，与空白组比较，模型组细胞 IL-8 mRNA 表达明显上调（ $P<0.01$ ），IL-13 mRNA 表达明显下调（ $P<0.01$ ），提示炎症模型建立成功。

表 2 两组 HT-29 细胞 IL-13、IL-8 表达比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	IL-8	IL-13
空白组	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.16
模型组	10.89 $\pm$ 1.80 ^{a)}	0.27 $\pm$ 0.02 ^{b)}

注：a)与空白组比较， $P<0.01$ ；b)与空白组比较， $P<0.05$ 。

3.2 黄芪-败酱草用药浓度筛选结果

表 3 示，与空白对照组比较，模型对照组 HT-29 细胞活力升高（ $P<0.05$ ）；与模型对照组比较，黄芪-败酱草浓度为 2.25、4.5、9 mg/ml 时 HT-29 细胞活力升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ），浓度为 18、36、72、144 mg/ml 时 HT-29 细胞活力降低（ $P<0.01$ ）。因此，分别将浓度 2.25、4.5、9 mg/ml 的黄芪-败酱草设置为低、中、高剂量进行后续实验。

3.3 各组细胞炎症因子含量比较

表 4 示，与空白组相比，模型组 IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 含量升高，IL-13 含量减少（ $P<0.01$ ）。与模型组相比，各给药组 IL-6、IL-18 含量均减少（ $P<0.01$ ）；除黄芪-败酱草低剂量组外，其余各给药组 IL-1 β 、TNF- α 含量均减少（ $P<0.05$ ）。

表3 各组 HT-29 细胞活力比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/mg·ml ⁻¹	孔数	细胞活力
空白对照组	—	6	0.85±0.10
模型对照组	—	6	1.01±0.11 ^{a)}
黄芪-败酱草组	1.125	6	1.02±0.07
	2.25	6	1.17±0.07 ^{b)}
	4.5	6	1.32±0.08 ^{c)}
	9	6	1.49±0.09 ^{c)}
	18	6	0.76±0.06 ^{c)}
	36	6	0.59±0.07 ^{c)}
	72	6	0.28±0.04 ^{c)}
	144	6	0.26±0.04 ^{c)}

注: a) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b) 与模型对照组比较, $P < 0.05$; c) 与模型对照组比较, $P < 0.01$ 。

“—”表示无此数据。

或 $P < 0.01$); 各给药组 IL-13 含量均增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与美沙拉嗪组相比, 黄芪-败酱草高、中、低剂量组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量均升高, IL-13 含量均降低, 黄芪-败酱草中、低剂量组 IL-18 含量均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与黄芪-败酱草高剂量组比较, 黄芪-败酱草中、低剂量组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量均升高, IL-13 含量均降低, 黄芪-败酱草低剂量组 IL-18 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与黄芪-败酱草中剂量组比较, 黄芪-败酱草低剂量组 IL-18 含量升高 ($P < 0.05$)。

3.4 各组细胞 Occludin、Claudin-1 蛋白表达比较

表 5 示, 与空白组相比, 模型组 Occludin、Claudin-1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 美沙拉嗪组和黄芪-败酱草高剂量组 Occludin、Claudin-1 蛋白表达升高, 黄芪-败酱草中剂量组 Occludin 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。与美沙拉嗪组相比, 黄芪-败酱草低剂量组 Occludin 蛋白、Claudin-1 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$), 黄芪-败酱草中剂量组 Claudin-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 黄芪-败酱

草高剂量组 Occludin、Claudin-1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与黄芪-败酱草高剂量组比较, 黄芪-败酱草低剂量组 Occludin、Claudin-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与黄芪-败酱草中剂量组比较, 黄芪-败酱草低剂量组 Occludin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

表5 各组细胞 Occludin、Claudin-1 蛋白表达比较

(/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	Occludin	Claudin-1
空白组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	0.63±0.11 ^{a)}	0.63±0.01 ^{a)}
美沙拉嗪组	3	1.11±0.02 ^{b)}	1.08±0.18 ^{b)}
黄芪-败酱草低剂量组	3	0.78±0.13 ^{c) e) g)}	0.70±0.02 ^{c) f)}
黄芪-败酱草中剂量组	3	0.94±0.03 ^{b)}	0.80±0.10 ^{d)}
黄芪-败酱草高剂量组	3	1.07±0.06 ^{b)}	0.96±0.09 ^{b)}

注: Occludin, 咬合蛋白; Claudin-1, 紧密连接蛋白 1。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与美沙拉嗪组比较, $P < 0.01$; d) 与美沙拉嗪组比较, $P < 0.05$; e) 与黄芪-败酱草高剂量组, $P < 0.01$; f) 与黄芪-败酱草高剂量组比较, $P < 0.05$; g) 与黄芪-败酱草中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 各组细胞 JAK1/STAT6/SOCS1 通路相关蛋白表达比较

表 6 示, 与空白组比较, 模型组 p-JAK1、p-STAT6 蛋白表达上调, SOCS1 蛋白表达下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 除黄芪-败酱草低剂量组 p-JAK1 外, 各给药组 p-JAK1、p-STAT6 蛋白表达显著下调, 美沙拉嗪组和黄芪-败酱草高剂量组 SOCS1 蛋白表达上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与美沙拉嗪组相比, 黄芪-败酱草低剂量组 p-JAK1 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。黄芪-败酱草各剂量组 p-JAK1、p-STAT6、SOCS1 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞 JAK1、STAT6 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表4 各组细胞炎症因子水平比较

(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	IL-6	IL-1 β	IL-18	TNF- α	IL-13
空白组	3	457.30±309.90	19.60±8.32	1281.00±204.10	169.70±32.81	979.40±59.13
模型组	3	19711.00±504.00 ^{a)}	112.90±8.88 ^{a)}	12253.00±1551.00 ^{a)}	683.60±24.11 ^{a)}	255.70±34.20 ^{a)}
美沙拉嗪组	3	5759.00±385.90 ^{b)}	46.98±4.55 ^{b)}	3907.00±92.60 ^{b)}	201.90±31.55 ^{b)}	787.90±7.18 ^{b)}
黄芪-败酱草低剂量组	3	14042.00±1161.00 ^{b) d) f)}	101.90±3.45 ^{d) f)}	8745.00±848.50 ^{b) d) f) h)}	610.40±24.71 ^{d) f)}	349.20±18.11 ^{c) d) f)}
黄芪-败酱草中剂量组	3	11198.00±601.90 ^{b) d) g)}	95.74±4.79 ^{c) d) f)}	6380.00±404.80 ^{b) e)}	457.70±26.30 ^{b) d) f)}	505.70±8.18 ^{b) d) f)}
黄芪-败酱草高剂量组	3	9298.00±703.40 ^{b) d)}	69.87±2.57 ^{b) d)}	5067.00±402.60 ^{b)}	349.40±27.91 ^{b) d)}	619.60±15.35 ^{b) d)}

注: IL-6, 白细胞介素 6; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-18, 白细胞介素 18; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-13, 白细胞介素 13。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与美沙拉嗪组比较, $P < 0.01$; e) 与美沙拉嗪组比较, $P < 0.05$; f) 与黄芪-败酱草高剂量组比较, $P < 0.01$; g) 与黄芪-败酱草高剂量组比较, $P < 0.05$; h) 与黄芪-败酱草中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

表6 各组细胞JAK1/STAT6/SOCS1通路相关蛋白表达比较 (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	p-JAK1	p-STAT6	SOCS1	JAK1	STAT6
空白组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	1.55±0.1 ^{a)}	1.37±0.24 ^{b)}	0.59±0.21 ^{b)}	1.44±0.19	1.25±0.18
美沙拉嗪组	3	0.97±0.12 ^{c)}	0.61±0.09 ^{c)}	1.16±0.24 ^{c)}	0.81±0.24	0.88±0.06
黄芪-败酱草低剂量组	3	1.24±0.06 ^{c)}	0.85±0.11 ^{c)}	0.77±0.04	1.14±0.17	1.12±0.13
黄芪-败酱草中剂量组	3	1.13±0.12 ^{c)}	0.71±0.15 ^{c)}	0.86±0.04	1.10±0.14	1.05±0.01
黄芪-败酱草高剂量组	3	1.06±0.11 ^{c)}	0.63±0.06 ^{c)}	1.05±0.17 ^{d)}	0.91±0.22	0.96±0.02

注：p-JAK1，磷酸化蛋白质酪氨酸激酶；p-STAT6，磷酸化信号转导和转录激活因子6；SOCS1，细胞因子信号传导抑制蛋白1；JAK1，蛋白质酪氨酸激酶；STAT6，信号转导和转录激活因子6。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与美沙拉嗪组比较， $P<0.05$ 。

3.6 各组JAK1/STAT6/SOCS1通路相关基因mRNA表达比较

表7示，与空白组比较，模型组JAK1、STAT6 mRNA表达上调，SOCS1 mRNA表达下调 ($P<0.01$)。与模型组相比，美沙拉嗪组和黄芪-败酱草高剂量组JAK1、STAT6 mRNA表达均下调，SOCS1 mRNA表达均上调，黄芪-败酱草中剂量组STAT6 mRNA表达下调，SOCS1 mRNA表达上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与美沙拉嗪组相比，黄芪-败酱草高剂量组JAK1、STAT6、SOCS1 mRNA表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)，黄芪-败酱草低、中剂量组STAT6 mRNA表达上调，SOCS1 mRNA表达下调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与黄芪-败酱草高剂量组比较，黄芪-败酱草低剂量组STAT6 mRNA表达升高，SOCS1 mRNA表达降低 ($P<0.01$)。与黄芪-败酱草中剂量组比较，黄芪-败酱草低剂量组STAT6 mRNA表达升高，SOCS1 mRNA表达降低 ($P<0.05$)。

4 讨论

UC属于中医学“痢疾”“肠痢”范畴。近年来相关指南总结其主要病机为活动期湿热蕴肠、邪毒损络，缓解期脾虚为本，湿热稽留^[12]。我们进一

步总结出UC的病机关键为脾气亏虚、毒损肠络，运用安肠愈疡汤健脾益气、解毒生肌治疗UC疗效显著^[13-14]。黄芪-败酱草药对由安肠愈疡汤精简而来，其中黄芪健脾补气，托疮生肌，托补兼施，是疮家圣药，《神农本草经》云：“黄芪，主痈疽久败疮，排脓止痛”。败酱草清热解毒，消痈排脓，《本草纲目》载其“善排脓破血，故仲景治痢及古方妇人皆用之”。黄芪补虚，败酱草解毒，标本兼顾，共奏健脾益气、解毒生肌之效。药理研究表明，败酱草及其有效成分槲皮素、败酱草多糖等具有抗炎、抑菌及调节免疫的作用，可能是通过以上作用用以治疗UC^[15-16]。

肠黏膜屏障功能受损是UC重要的病理改变^[17]。Claudin-1蛋白主要维持肠黏膜机械屏障的完整性和通透性，Occludin蛋白参与紧密连接形成的信号调节^[18-19]。研究表明，Occludin、Claudin-1表达下调后肠道通透性增加，使肠腔内的细菌等抗原物质移位、激活免疫细胞反应，诱发黏膜发生异常炎症反应^[20]。本研究结果显示，模型组较空白组Occludin和Claudin-1表达下调，黄芪-败酱草高剂量组较模型组Occludin、Claudin-1表达上调，且与美沙拉嗪组差异无统计学意义，提示黄芪-败酱草可以修复黏膜发挥保护作用，以高剂量

表7 各组细胞JAK1/STAT6/SOCS1通路相关基因mRNA表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	JAK1	STAT6	SOCS1
空白组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	5.91±1.53 ^{a)}	9.90±2.83 ^{a)}	0.47±0.11 ^{a)}
美沙拉嗪组	3	2.09±0.43 ^{b)}	2.23±0.47 ^{b)}	0.96±0.04 ^{b)}
黄芪-败酱草低剂量组	3	4.67±1.57	8.04±1.26 ^{d) f) g)}	0.56±0.09 ^{d) f) g)}
黄芪-败酱草中剂量组	3	4.06±1.32	6.09±0.60 ^{c) e)}	0.73±0.05 ^{b) e)}
黄芪-败酱草高剂量组	3	2.56±0.53 ^{c)}	3.31±0.19 ^{b)}	0.81±0.04 ^{b)}

注：JAK1，蛋白质酪氨酸激酶；STAT6，信号转导和转录激活因子6；SOCS1，细胞因子信号传导抑制蛋白1。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与美沙拉嗪组比较， $P<0.01$ ；e) 与美沙拉嗪组比较， $P<0.05$ ；f) 与黄芪-败酱草高剂量组比较， $P<0.01$ ；g) 与黄芪-败酱草中剂量组比较， $P<0.05$ 。

效果较佳, 且与美沙拉嗪效果相当。

IL-18 为炎症前细胞因子, 诱导 TNF- α 和多种趋化因子的基因表达, 可导致多种免疫性疾病^[21]。抗炎细胞因子 IL-13 具有调节单核巨噬细胞和 B 细胞功能, 可抑制单核巨噬细胞分泌致炎细胞因子和下调有细胞毒性的单核细胞功能^[21]。据文献报道, 促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 在活动期 UC 患者的肠黏膜和血清中呈高表达^[22]。IL-13 可阻断 UC 组织的肠上皮细胞和/或单核/巨噬细胞产生大量炎症性细胞因子和炎症介质^[23]。本研究结果表明, 与空白组比较, 模型组 IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 表达上调, IL-13 表达下调, 提示造模成功。黄芪-败酱草干预后, 黄芪-败酱草高、中剂量组致炎因子 IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 表达降低, 抗炎 IL-13 分泌增多, 其中 IL-18 表达呈剂量依赖性, 提示黄芪-败酱草可降低细胞炎症反应, 且以高剂量组效果最好。

JAK/STAT 作为一种快速的信号转导途径, 在炎症性肠病的发病机制中起着关键作用^[24], JAK/STAT 信号转导途径中胞质内磷酸化的 JAK 使受体链酪氨酸残基磷酸化, 并进一步诱导 STAT 磷酸化, 活化的 STAT 诱导下游基因的表达^[25]。抑制该通路可能导致多种炎性细胞因子的下调^[26]。SOCS 蛋白家族是 JAK/STAT 信号通路的经典负调节因子之一, SOCS 家族以 SOCS1 及 SOCS3 的研究最广泛^[27], 研究发现 SOCS1 表达上调, 可抑制 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等促炎因子的产生, 从而抑制炎症过程^[28-29]。本研究结果显示, 黄芪-败酱草高、中剂量组与模型组相比 JAK1、STAT6 mRNA 表达下调, SOCS1 mRNA 表达上调, 提示黄芪-败酱草在转录水平对 JAK1/STAT6/SOCS1 信号通路进行了有效调控, 以高、中剂量效果较好, 且与美沙拉嗪效果相当。与模型组相比, 黄芪-败酱草高剂量和美沙拉嗪组 p-JAK1、p-STAT6 表达下调, SOCS1 表达上调, 提示黄芪-败酱草高剂量能增加 JAK1、STAT6 的磷酸化水平, 且高剂量药效与美沙拉嗪相当。蛋白磷酸化是蛋白翻译后修饰的过程, 磷酸化后蛋白结构上发生变化, 是下游蛋白传递信号, 磷酸化水平影响下游分子的表达。本研究显示, 黄芪-败酱草能促进 JAK1、STAT6 的磷酸化, 从而促进 JAK1/STAT6/SOCS1 通路的活化, 提示黄芪-败酱草可通过调控 JAK1/STAT6/SOCS1 通路减轻 HT-29 细胞炎症模型的炎症反应, 修复黏膜发挥保护作用。本研究证明了黄芪-败酱草可调控 JAK1/STAT6/SOCS1

通路, 但是具体作用靶点尚不清楚, 下一步将设置 JAK1 抑制剂组、STAT6 抑制剂组以观察黄芪-败酱草药对的具体作用靶点。

参考文献

- [1]ROGLER G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer[J]. Cancer Lett, 2014,345(2):235-241.
- [2]GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020,5(1):17-30.
- [3]孙大娟,王晗璐,王帅,等. 安肠愈疡汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜屏障的修复作用及机制研究[J]. 天津中医药,2021,38(12):1590-1596.
- [4]刘佳卉. 基于数据挖掘的迟莉丽教授辨治溃疡性结肠炎的规律研究[D]. 济南:山东中医药大学,2020.
- [5]王登,闫抗抗,王娣. 基于数据挖掘含败酱草中成药组方规律研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2019,25(11):1590-1593.
- [6]马莉莉. 基于中医传承辅助系统分析曹志群教授治疗溃疡性结肠炎用药规律[D]. 济南:山东中医药大学,2018.
- [7]JUNG HC, ECKMANN L, YANG SK, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion[J]. J Clin Invest, 1995,95(1):55-65.
- [8]SAYOC-BECERRA A, KRISHNAN M, FAN S, et al. The JAK-inhibitor tofacitinib rescues human intestinal epithelial cells and colonoids from cytokine-induced barrier dysfunction [J]. Inflamm Bowel Dis, 2020, 26 (3) : 407-422.
- [9]白金霞,张婷,卢美琪,等. 溃疡性结肠炎体外模型研究进展[J]. 山东第一医科学(山东省医学科学院)学报, 2022,43(8):631-634.
- [10]孙大娟,樊静娜,王帅,等. 基于 JAK1/STAT6 通路探讨安肠愈疡汤对 HT-29 细胞炎症模型的影响及机制研究[J]. 天津中医药,2020,37(8):936-942.
- [11]CHO EJ, SHIN JS, NOH YS, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaeifolia* in mice with ulcerative colitis [J]. J Ethnopharmacol. 2011,136(3):428-435.
- [12]沈洪,唐志鹏,唐旭东,等. 消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南(基层医生版)[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9):4155-4160.
- [13]樊静娜,赵继亭,迟莉丽,等. 安肠愈疡汤联合美沙拉

- 秦治疗脾虚湿阻型溃疡性结肠炎的疗效评价及对炎症因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3765-3770.
- [14]迟莉丽, 樊静娜, 孙大娟, 等. 安肠愈疡汤联合美沙拉秦对溃疡性结肠炎不同肠段内镜下及组织病理学表现的影响[J]. 山东中医杂志, 2020, 39(9): 936-943.
- [15]赵妮, 方彩霞, 王龙龙, 等. 北败酱草镇痛、抗炎及体外抑菌作用探讨[J]. 西部中医药, 2020, 33(11): 26-29.
- [16]吕品田, 孙颖光, 刘斌. 败酱草多糖的免疫调节作用及对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的影响研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 212-215.
- [17]YU LC, WANG JT, WEI SC, et al. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology [J]. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012, 3(1): 27-43.
- [18]张慧利, 罗序睿, 李爱连, 等. 大鼠心脏骤停心肺复苏后 Occludin 蛋白表达及其对血脑屏障的影响[J]. 中国医药, 2016, 11(4): 506-510.
- [19]石永言, 富建华, 姚丽, 等. 维生素 D 调节坏死性小肠结肠炎新生大鼠肠道上皮 occludin 蛋白表达的研究[J]. 中国小儿急救医学, 2017, 24(1): 60-64.
- [20]谭悦, 郑长清. 紧密连接蛋白 occludin、ZO-1 在溃疡性结肠炎中的表达及其临床意义[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(7): 1803-1808.
- [21]李晓东, 张学彦, 郑磊, 等. 白细胞介素在溃疡性结肠炎中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(1): 4-7.
- [22]宋爱玲. TNF- α 、IL-6、IL-8 与溃疡性结肠炎严重程度相关研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(36): 3-4.
- [23]TARGAN SR, KARP LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis [J]. Immunol Rev, 2005, 206: 296-305. doi: 10. 1111/j. 0105-2896. 2005. 00286. x.
- [24]XIN P, XU X, DENG C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106210. doi: 10. 1016/j. intimp. 2020. 106210.
- [25]BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, et al. STATs in oncogenesis[J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2474-2488.
- [26]DANESE S, GRISHAM M, HODGE J, et al. JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for multiple inflammatory cytokines[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 310(3): G155-G162.
- [27]葛改, 杨智雅, 张祥宇, 等. SOCS 通过调控 JAK/STAT 通路影响 Th 细胞分化在感染性疾病中的作用研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2021, 16(1): 51-55.
- [28]HU J, WANG W, HAO Q, et al. Suppressors of cytokine signalling (SOCS)-1 inhibits neuroinflammation by regulating ROS and TLR4 in BV2 cells [J]. Inflamm Res, 2020, 69(1): 27-39.
- [29]CHRISTOPHI GP, RONG R, HOLTZAPPLE PG, et al. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(12): 2342-2356.

Effect of Drug Pair Huangqi (*Radix Astragali*) & Baijiangcao (*Herba Patriniae*) on HT-29 Cell Inflammation Model by Regulating JAK1/STAT6/SOCS1 Signaling Pathway

SUN Dajuan¹, WEI Xiunan², CHENG Yan¹, CHI Lili¹

1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250014; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of drug pair Huangqi (*Radix Astragali*) & Baijiangcao (*Herba Patriniae*) in the treatment of ulcerative colitis (UC). **Methods** After 24-hour intervention of 20 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) on HT-29 cells, an inflammatory cell model was established. Huangqi & Baijiangcao at eight different concentrations (1. 125, 2. 25, 4. 5, 9, 18, 36, 72, 144 mg/ml) were used on the inflammatory cell model for 24 hours, and the cell viability was detected by CCK-8 method to obtain the top three for follow-up experiments. There were six groups including blank group, model group, mesalazine group and Huangqi & Baijiangcao low-, middle- and high-dose groups. After modeling, 100 μ l of 1 mg/ml 5-aminosalicylic acid was given to the mesalazine group, and 100 μ l of the obtained low, medium and high concentrations of Huangqi & Baijiangcao was given to the corresponding three Huangqi-Baijiangcao groups, respectively; 100 μ l complete medium was used in the blank group and model group. All groups were intervened for 24 hours. The expression of inflammatory factors interleukin 13 (IL-13), interleukin 6 (IL-6), interleukin 18 (IL-18), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) was detected by ELISA. The protein expression of Occludin, Claudin-1, phosphorylated protein tyrosine kinase 1 (p-JAK1), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 6 (p-STAT6), protein tyrosine kinase 1

(JAK1), signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6), and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) was detected by Western blot, and the mRNA expression of JAK1, STAT6, SOCS1 was detected by qRT-PCR. **Results** Finally, 2.25 mg/ml, 4.5 mg/ml and 9 mg/ml of Huangqi & Baijiangcao were obtained as low, medium and high concentrations. Compared to those in the model group, the expressions of IL-6, IL-1 β , IL-18 and TNF- α decreased in high-dose Huangqi & Baijiangcao group and mesalamine groups, while the expression of IL-13 increased; the protein expression of Occludin, Claudin-1 and SOCS1, as well as the SOCS1 mRNA expression were up-regulated, while p-JAK1, p-STAT6 protein expression and JAK1, STAT6 mRNA expression were down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The high-dose Huangqi & Baijiangcao group had higher IL-6, IL-1 β , and TNF- α , and lower expression of IL-13 than the mesalamine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while no statistical differences in Occludin, Claudin-1 protein expression, JAK1, STAT6, and SOCS1 mRNA expression between the two group ($P > 0.05$). **Conclusion** Huangqi & Baijiangcao may down-regulate the expression of inflammatory factors through JAK1/STAT6/SOCS1 pathway, thereby acting on the inflammation and repairing intestinal mucosal barrier.

Keywords ulcerative colitis; Huangqi (*Radix Astragali*); Baijiangcao (*Herba Patriniae*); inflammatory factors; intestinal mucosal barrier; JAK1/STAT6/SOCS1 pathway

(收稿日期: 2022-05-05; 修回日期: 2022-11-10)

[编辑: 王利芬]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

广告

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951 年—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951 年—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951 年—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘)480 元

1987 年—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘)260 元

1995 年—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘)280 元

2005 年—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘)300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5—《中医杂志》(1987—1994)

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

