

黄芩苷对溃疡性结肠炎患者信号转导和转录激活因子表达的影响

于丰彦¹ 黄绍刚² 张海燕² 迟宏罡¹ 邹颖¹ 吕汝西^{1,3} 郑学宝¹

摘要 目的 研究黄芩苷对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者信号转导和转录激活因子表达的干预作用。**方法** 选取 2010 年 6 月—2011 年 1 月广东省中医院大学城分院和南方医科大学南方医院消化内科门诊、住院部及消化内镜中心的患者作为研究对象,其中 UC 患者 33 例(UC 组),腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)患者 30 例(IBS-D 组),以 30 名健康体检者为健康对照组。取不同浓度的黄芩苷体外干预 UC 患者外周血单个核细胞。采用 Q-PCR 检测不同浓度黄芩苷体外干预下 UC 患者 IL23R 基因表达;应用 Western blot 法检测各组外周血单个核细胞信号转导和转录激活因子(STAT)4、STAT6 及磷酸化(p)-STAT4、p-STAT6 蛋白表达,ELISA 法检测各组血清中 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平变化,同时检测不同浓度黄芩苷对 UC 患者外周血单个核细胞蛋白表达及细胞因子 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平的影响。**结果** 与阴性对照组比较,浓度为 40 μmol 黄芩苷对 UC 患者 IL23R 基因表达明显下降($P < 0.01$)。与健康对照组和 IBS-D 组比较,UC 组患者 p-STAT4/STAT4 值均增高($P < 0.05$),p-STAT6/STAT6 值均下降($P < 0.05$),IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平均升高($P < 0.05$)。UC 患者在体外黄芩苷干预下,分别与阴性对照组、黄芩苷 5、10 μmol 组比较,浓度为 20、40 μmol 黄芩苷 p-STAT4/STAT4 值均下降($P < 0.05$),浓度为 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷 p-STAT6/STAT6 值均增高($P < 0.05$);浓度为 20、40 μmol 黄芩苷 IFN- γ 、IL-4 水平降低($P < 0.05$),IL-10 水平升高($P < 0.05$)。**结论** 浓度为 40 μmol 黄芩苷的体外抑制 p-STAT4/STAT4,调节 p-STAT6/STAT6 及相关细胞因子,使免疫平衡而缓解溃疡性结肠的炎症反应。

关键词 溃疡性结肠炎;信号转导和转录激活因子 4;信号转导和转录激活因子 6;磷酸化信号转导和转录激活因子 6/信号转导和转录激活因子 6;黄芩苷

Effect of Baicalin on Signal Transduction and Activating Transcription Factor Expression in Ulcerative Colitis Patients YU Feng-yan¹, HUANG Shao-gang², ZHANG Hai-yan², CHI Hong-gang¹, ZOU Ying¹, LU Ru-xi^{1,3}, and ZHENG Xue-bao¹ 1 Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Medical College, Guangdong (524023), China; 2 Department of Gastroenterology, College City Branch, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (511495), China; 3 College of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou(510515), China

ABSTRACT Objective To explore the intervention of baicalin on signal transduction and activating transcription factor expression of ulcerative colitis (UC) patients. **Methods** Recruited were UC patients at Outpatient Department of Digestive Disease, Inpatient Department of Digestive Disease, Center for Digestive Endoscopy of College City Branch, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, and Southern Hospital affiliated to Southern Medical University from June 2010 to January 2011. They were assigned to the UC group (33 cases) and the diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) group (30 cases). Another 30 healthy subjects were recruited as a healthy control group. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) *in vitro* intervened by different concentrations baicalin were

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30772701);广东省东莞市科技计划项目(No. 2008108101032)

作者单位:1. 广东医学院中医研究室(广东 524023);2. 广东省中医院大学城分院脾胃科(广州 511495);3. 南方医科大学中医药学院(广州 510515)

通讯作者:于丰彦, Tel:18922303887, E-mail: yujoyce022@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 04. 0419

taken from UC patients. IL23R gene expressions *in vitro* intervened by different concentrations baicalin were detected using Q-PCR. Expressions of signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4), STAT6, phosphorylated-STAT4 (p-STAT4), and p-STAT6 were detected using Western blot. Serum levels of IFN- γ , IL-4, IL-6, and IL-10 were measured by ELISA. Effects of different concentrations baicalin on expressions of PBMCs, and levels of IFN- γ , IL-4, IL-10 of UC patients were also detected. Results Compared with the negative control group, 40 μ mol baicalin obviously decreased IL23R gene expression of UC patients ($P < 0.01$). Compared with the healthy control group and the IBS-D group, p-STAT4/STAT4 ratios increased, p-STAT6/STAT6 ratios decreased, levels of IFN- γ , IL-4, IL-10 all increased in the US group (all $P < 0.05$). Compared with the negative control, 5 and 10 μ mol baicalin groups, 20 and 40 μ mol baicalin obviously decreased p-STAT4/STAT4 ratios (all $P < 0.05$); 20 and 40 μ mol baicalin obviously increased p-STAT6/STAT6 ratios (all $P < 0.05$); 20 and 40 μ mol baicalin obviously lowered levels of IFN- γ and IL-4, and elevated IL-10 levels (all $P < 0.05$). Conclusion 40 μ mol baicalin could *in vitro* inhibit p-STAT4/STAT4 ratios, adjust p-STAT6/STAT6 ratios and related cytokines, thereby balancing the immunity and relieving inflammatory reactions of UC.

KEYWORDS ulcerative colitis; STAT4; STAT6; p-STAT6/STAT6; baicalin

肠黏膜的免疫反应失调是溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的特征性表现, 蛋白酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK/STAT) 途径是免疫介导的炎症反应, 为细胞生长、活化、分化、凋亡及其功能发挥过程中一条重要的细胞内信号转导途径^[1, 2]。IL-12、IL-23 通过信号转导和转录激活因子 (STAT)4 的信号转导使 T 细胞分化为辅助性 T 淋巴细胞 1 (Th1); IL-4、IL-13 通过 STAT6 的信号转导使 T 细胞向辅助性 T 淋巴细胞 2 (Th2) 分化。Th1 主要分泌 IFN- γ 和 IL-23, Th2 主要分泌 IL-4 和 IL-10, 两者之间的平衡起免疫调节作用^[3]。STAT4、STAT6 蛋白表达失调可能干扰 T 细胞向 Th1 和 Th2 分化, 并由此可减轻自身免疫性疾病 (如关节炎、肠炎等) 的疾病活动度^[4]。

黄芩苷是从黄芩中提取的黄酮类葡萄糖醛酸苷。于小凤^[5]、陈芳等^[6]实验证实了黄芩苷具有抗菌抗病毒作用, 对结肠组织的修复也有一定的功效。目前 STAT4、STAT6 及相关细胞因子在 UC 中的表达情况的研究不多。本研究应用分子生物学方法检测 STAT4、STAT6 及体外用黄芩苷干预后的表达水平, 旨在从分子水平上探讨 UC 的发病机制, 现将报道如下。

资料与方法

1 诊断标准 UC 诊断标准参照《中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》^[7]。肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 诊断标准依据罗马 III 标准的腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)^[8]。中医辨证分型诊断标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[9], 辨证

分为湿热型、脾 (气) 虚型、脾虚湿热型。

2 纳入及排除标准 纳入标准: (1) 符合 UC 诊断标准、IBS-D 诊断标准及中医辨证分型诊断标准; (2) 年龄 19 ~ 60 岁; (3) 签署知情同意书。排除标准: (1) IBD 出现结肠癌变者; (2) 合并其他免疫系统疾病如系统性红斑狼疮、多发性硬化病等; (3) 合并消化系统意外其他肿瘤者。

3 一般资料 选取 2010 年 6 月—2011 年 1 月广东省中医院大学城分院和南方医科大学南方医院消化内科门诊、住院部以及消化内镜中心的患者, 其中 33 例符合 UC 诊断标准为 UC 组, 30 例符合 IBS 诊断标准为 IBS-D 组, 30 名来自广东省中医院大学城分院的健康体检者为健康对照组。其中 UC 组男性 18 例, 女性 15 例, 年龄 22 ~ 56 岁, 平均 (39 $\pm$ 17) 岁; 病程 (16.4 ~ 20.0) 年, 平均 (1.8 $\pm$ 18.2) 年; IBS 组男性 16 例, 女性 14 例, 年龄 18 ~ 60 岁, 平均 (39 $\pm$ 21) 岁; 病程 (18.8 ~ 22.0) 年, 平均 (1.6 $\pm$ 20.4) 年; 健康对照组男性 15 名, 女性 15 名, 年龄 23 ~ 62 岁, 平均 (42.5 $\pm$ 19.5) 岁。UC 组、IBS-D 组及健康对照组在年龄、性别及病程等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 外周血单个核淋巴细胞 (PBMCs) 的制备 采用 Ficoll 密度梯度离心法, 受检者于受检日清晨空腹抽取静脉血 2 mL, 用肝素抗凝, 以 RPMI1640 液等体积稀释。在 10 mL 离心管中加入 2 mL 人淋巴细胞分离液, 用滴管将稀释后的抗凝血缓慢沿管壁滴入管中, 叠加与分层液面上, 2 500 r/min, 离心 20 min; 离心后用毛细血管插到在上、中层界面处的白色云雾层狭窄带, 吸取单个核细胞置入另一管中, 加入 5 倍体

积的 RPMI1640 液,充分混匀后,2 000 r/min,离心 10 min,洗涤细胞 2 次;末次离心后,弃上清,加入含有 10% 小牛血清的 RPMI1640,重悬细胞。计数淋巴细胞,稀释细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$,取 1 mL 生长对数期细胞悬液置于试管中,放入冰箱备用。

5 培养板包被及分组 实验前夜 CD3 抗体包被细胞培养板,取 5 μL CD3 原液,于 1 mL PBS 中混匀,分到 96 培养板孔中,每孔 50 μL 。4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日用移液枪吸走抗体溶液,用 12 mL PBS 洗板 2 次。调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。每孔分 200 μL T 淋巴细胞溶于完全培养基中(完全培养基: RPMI1640、10%胎牛血清、双抗 100 U/mL),每组 3 个复孔。细胞接种至包被 CD3 抗体(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 96 孔培养板中。实验分为未干预组、阴性对照组[予以二甲基亚砜(DMSO)]及 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷干预组,各组分别 72 h 后收集培养上清进行 ELISA 检测,然后分别进行各指标检测。

6 观察指标及检测方法

6.1 不同浓度组黄芩苷体外干预下 UC 患者 IL23R 基因表达 采用 Q-PCR 检测方法。PCR 目的基因 IL23 受体上游: 5'-CTGGGCTAACAGTTGCTTCC-3', IL23 受体下游: 5'-CAAAGACGATCAT-TCCCAATAAA-3'。内参基因: 18srRNA 上游: 5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3', 18srRNA 下游 5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'。取外周静脉血各 1 mL,用人淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞。按照 TRIzol 一步法提取 PBMC 总 mRNA,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。cDNA 合成按照试剂盒说明书操作,反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 32 s 读板,40 个循环; 熔解曲线分析: 温度 60 $^{\circ}\text{C}$ ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ 。每个样本重复 3 次。收集荧光信号,得到 Ct 值。循环结束应用系统软件绘制扩增曲线、熔解曲线。由软件得出 RQ 值,即是所检测目的基因的相对表达量。

6.2 STAT4、STAT6、磷酸化(P)-STA4 及 P-STAT6 蛋白表达量 采用 Western blot 检测法。提取并检测培养细胞蛋白,采用裂解缓冲液经匀浆裂解提取蛋白。根据总蛋白测定试剂盒说明书测定样本中的总蛋白含量及电泳上样量。电泳、转膜、染色、去离子水震荡去除浮色,5% 脱脂奶粉封闭,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入 STAT4、P-STAT4 和 STAT6、P-STAT6 单克隆抗体孵育,洗涤后加入二抗孵育,洗涤后加入底物孵育,取出 NC 膜并用蒸馏水漂洗后晾干,将胶片进行

扫描或拍照,用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

6.3 血清 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平 采用 ELISA 法检测。按试剂盒说明书操作。使用酶标仪(Thermo, MULTISKAN MK3)在 450 nm 处测定 A 值,转化为浓度。

7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析后再进行 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度黄芩苷对 UC 患者 IL23R 基因表达比较(表 1,图 1、2) 与阴性对照组比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷干预 IL23R 基因表达明显下降,差异有统计学意

表 1 不同浓度黄芩苷对 UC 患者 IL23R 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL23R2 - $\Delta\Delta\text{Ct}$
未干预	3	1.00 $\pm$ 0.12
阴性对照	3	0.91 $\pm$ 0.05
黄芩苷 5 $\mu\text{mol/L}$	3	0.94 $\pm$ 0.12
10 $\mu\text{mol/L}$	3	0.75 $\pm$ 0.05
20 $\mu\text{mol/L}$	3	0.78 $\pm$ 0.13
40 $\mu\text{mol/L}$	3	0.24 $\pm$ 0.06 *

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

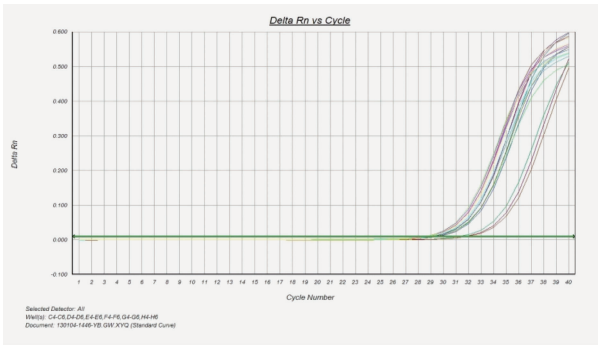


图 1 Q-PCR 检测 IL23R 的扩增曲线图

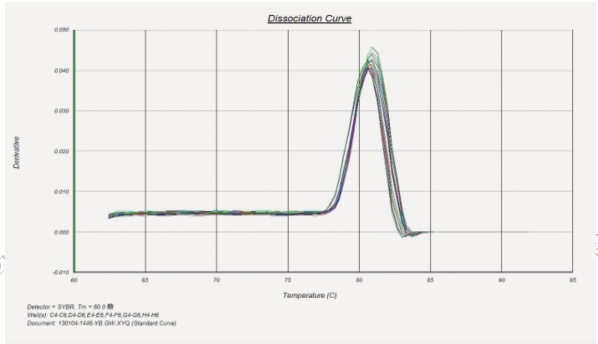
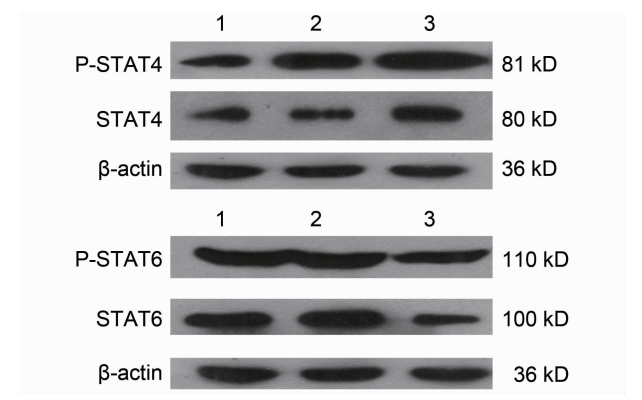


图 2 Q-PCR 检测 IL23R 的熔解曲线图

义($P = 0.013$); 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷干预下 IL-23R 均下降,但差异无统计学意义($P = 0.125$)。

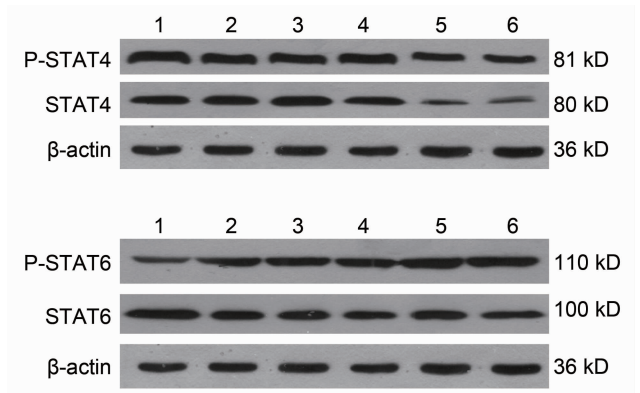
2 各组 p-STAT4、STAT4、p-STAT6 及 STAT6 蛋白表达比较(表 2,图 3) 分别与健康对照组和 IBS-D 组比较,UC 组 p-STAT4/STAT4 值增高, p-STAT6/STAT6 值降低($P < 0.05$); IBS-D 组与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:1 为健康对照组;2 为 IBS-D 组;3 为 UC 组

图 3 各组 p-STAT4、STAT4、p-STAT6 及 STAT6 蛋白表达比较图

3 不同浓度黄芩苷对 UC 患者 p-STAT4、STAT4、p-STAT6 及 STAT6 蛋白表达的影响(表 3,图 4) 与阴性对照组、黄芩苷 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,



注:1 为未干预组;2 为阴性对照组;3 为黄芩苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 组;4 为黄芩苷 10 $\mu\text{mol/L}$ 组;5 为黄芩苷 20 $\mu\text{mol/L}$ 组;6 为黄芩苷 40 $\mu\text{mol/L}$ 组

图 4 不同浓度黄芩苷对 p-STAT4、STAT4、p-STAT6、STAT6 蛋白表达比较图

在浓度为 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷干预下 p-STAT4/STAT4 值均下降($P < 0.05$);浓度为 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷 p-STAT6/STAT6 值增高($P < 0.05$)。

4 各组 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平比较(表 4) 与健康对照组比较,IBS-D 组 IFN- γ 、IL-4、IL-10 差异无统计学意义($P > 0.05$),UC 组血清各检测指标均有不同程度升高($P < 0.05$);与 IBS-D 组比较,UC 组血清各指标亦升高($P < 0.05$)。

表 2 各组 p-STAT4、STAT4、p-STAT6 及 STAT6 蛋白表达比较

组别	例数	p-STAT4 ($\bar{x} \pm s$)	STAT4 ($\bar{x} \pm s$)	p-STAT4/ STAT4	p-STAT6 ($\bar{x} \pm s$)	STAT6 ($\bar{x} \pm s$)	p-STAT6/ STAT6
健康对照	30	1 181.670 $\pm$ 0.012	4 542.986 $\pm$ 0.011	0.26	3 268.009 $\pm$ 0.010	3 261.965 $\pm$ 0.009	1.00
IBS-D	30	1 529.897 $\pm$ 0.009	4 563.429 $\pm$ 0.012	0.34	3 136.727 $\pm$ 0.011	3 188.191 $\pm$ 0.010	0.98
UC	33	2 835.066 $\pm$ 0.010	4 703.657 $\pm$ 0.095	0.60 * Δ	2 525.614 $\pm$ 0.010	3 341.532 $\pm$ 0.011	0.76 * Δ

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$;与 IBS-D 组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 不同浓度黄芩苷对 UC 患者 p-STAT4、STAT4、p-STAT6 及 STAT6 蛋白表达的影响

组别	n	p-STAT4 ($\bar{x} \pm s$)	STAT4 ($\bar{x} \pm s$)	p-STAT4/ STAT4	p-STAT6 ($\bar{x} \pm s$)	STAT6 ($\bar{x} \pm s$)	p-STAT6/ STAT6
未干预	3	1 771.903 8 $\pm$ 0.015	1 368.323 $\pm$ 0.013	1.29	1 154.952 0 $\pm$ 0.012	1 127.220 $\pm$ 0.011	1.02
阴性对照	3	1 550.050 9 $\pm$ 0.010	1 153.783 $\pm$ 0.011	1.34	1 234.912 8 $\pm$ 0.015	1 043.301 $\pm$ 0.010	1.18
黄芩苷 5 $\mu\text{mol/L}$	3	1 628.692 4 $\pm$ 0.009	1 290.059 $\pm$ 0.010	1.26	1 317.242 6 $\pm$ 0.009	1 555.754 $\pm$ 0.009	0.85
10 $\mu\text{mol/L}$	3	1 882.729 5 $\pm$ 0.011	1 816.349 $\pm$ 0.012	1.04	1 340.052 7 $\pm$ 0.009	1 789.632 $\pm$ 0.010	0.75
20 $\mu\text{mol/L}$	3	876.846 9 $\pm$ 0.009	1 687.103 $\pm$ 0.009	0.52 * $\Delta\Delta$	2 515.776 6 $\pm$ 0.010	1 228.244 $\pm$ 0.011	2.05 * $\Delta\Delta$
40 $\mu\text{mol/L}$	3	815.657 1 $\pm$ 0.009	1 494.402 $\pm$ 0.009	0.55 * $\Delta\Delta$	2 405.88 90 $\pm$ 0.001	1 328.410 $\pm$ 0.013	1.81 * $\Delta\Delta$

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与黄芩苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $\Delta P < 0.05$;与黄芩苷 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

表 4 各组 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IFN- γ	IL-4	IL-10
健康对照	30	2.11 $\pm$ 1.70	27.08 $\pm$ 0.13	4.85 $\pm$ 0.07
IBS-D	30	3.24 $\pm$ 2.54	10.07 $\pm$ 0.22	6.71 $\pm$ 0.12
UC	33	8.77 $\pm$ 0.32 * Δ	35.26 $\pm$ 0.18 * Δ	9.34 $\pm$ 0.13 * Δ

注:与健康对照组比较, * $P < 0.05$;与 IBS-D 组比较, $\Delta P < 0.05$

5 不同浓度黄芩苷对 UC 患者 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平的影响(表 5) 分别与阴性对照组、黄芩苷 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,黄芩苷 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组 IFN- γ 和 IL-4 水平均明显下降,IL-10 水平明显增高($P < 0.05$);其他各组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5 不同浓度黄芩苷对 UC 患者 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 水平的影响 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IFN- γ	IL-4	IL-10
未干预	3	14.57 $\pm$ 0.31	15.21 $\pm$ 0.19	4.35 $\pm$ 0.14
阴性对照	3	14.77 $\pm$ 0.23	14.59 $\pm$ 0.22	4.03 $\pm$ 0.07
黄芩苷 5 $\mu\text{mol/L}$	3	13.23 $\pm$ 0.31	9.07 $\pm$ 0.21	5.03 $\pm$ 0.12
10 $\mu\text{mol/L}$	3	12.36 $\pm$ 0.12	10.61 $\pm$ 0.12	6.53 $\pm$ 0.18
20 $\mu\text{mol/L}$	3	8.59 $\pm$ 0.30 * $\Delta\Delta$	8.42 $\pm$ 0.22 * $\Delta\Delta$	11.47 $\pm$ 0.12 * $\Delta\Delta$
40 $\mu\text{mol/L}$	3	8.06 $\pm$ 0.30 * $\Delta\Delta$	8.92 $\pm$ 0.33 * $\Delta\Delta$	11.9 $\pm$ 0.07 * $\Delta\Delta$

注:与阴性对照组比较, * $P < 0.05$;与黄芩苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $\Delta P < 0.05$;与黄芩苷 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

炎症性肠病是肠道的慢性非特异性炎症性疾病,包括 UC 和克罗恩病(Crohn's disease,CD)两种疾病,目前病因尚不明确。免疫因素在 UC 发病中的作用最为肯定,近年发现 STAT 蛋白家族成员参与了多种细胞因子、生长因子的信号转导,调控人体免疫反应、炎症反应以及细胞的生长、分化等,近年来认为 STAT 蛋白在 IBD 的发病机制中发挥重要作用。

STAT4 主要由 IL-12 诱导的反应所激活^[10,11],研究发现 STAT4 缺陷小鼠在对 IL-12 刺激的反应中会出现 IFN- γ 的产生和 NK 细胞活性方面的缺陷^[12]。这些小鼠也可使 IL-18R、CCR5、E 选择素和 P 选择素配体表达受损以及 IL-12RB2 表达下降,而且在 STAT4 不存在时,IL-12RB2 的转基因表达不能恢复 Th1 分化^[13,14]。STAT4 被认为是调节 Th1 分化的转录因子,STAT4 的活化具有致炎作用。有研究发现 UC 和 CD 患者以及作为对照组的肠易激综合征患者,其结肠黏膜组织中磷酸化的 STAT4 的表达均增高,但 UC 患者 STAT4 升高较显著^[15]。庞艳华等^[16]研究结果显示:P-STAT4 存在于 UC 组织中,并明显高于对照组。因为 P-STAT4 代表活化状态的

STAT4,说明 STAT4 在 UC 患者的发病中起作用,STAT4 的表达增高可能导致了 UC 的炎症过程。

STAT6 是一种 Mr94 的蛋白质,通过 JAK—STAT 信号转导途径介导 Th2 细胞因子 IL-4 及 IL-13 诱导的基因表达^[17],特别是在促进 IL-4 诱导的 MH-CII 类抗原及免疫球蛋白受体等的表达以及 Th2 细胞和淋巴细胞的发育上发挥了重要的作用,是介导 Th2 的关键转录因子之一,因而 STAT6 的活化有抗炎作用。赵佳等^[18]和张建林等^[19]的研究显示 UC 结肠黏膜 STAT6 较健康对照组无明显变化,但经复方中药干预下结肠黏膜的 STAT6 较治疗前明显下降,通过抑制 STAT6 调节免疫而达到改善临床症状。

既往研究显示黄芩苷具有抗菌、抗病毒、抗氧化及清除自由基等药理活性,抑制多种细胞因子和炎性介质的产生,预防细胞因子的级联反应,减轻多种蛋白酶与炎性介质对组织的损害^[20],避免炎症反应进一步发展。本研究通过检测 UC、IBS-D 及健康对照外周血单个核细胞的 STAT4 和 STAT6、p-STAT4 和 STAT6 及相关细胞因子,并通过不同浓度渐进式黄芩苷体外干预,发现 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的黄芩苷对 p-STAT4/STAT4 和 p-STAT6/STAT6 及其相关细胞因子有调节作用,研究结果与以往黄芩苷对炎症反应的干预研究结果相似并量化了黄芩苷的干预作用^[21,22],从上述研究中进一步证实了黄芩苷是一种潜在的免疫抑制剂^[23,24],可以通过调节 p-STAT4/STAT4、p-STAT6/STAT6 及相关细胞因子,使 UC 的细胞免疫得以平衡并缓解溃疡性结肠的炎症反应。

参 考 文 献

[1]

欧阳钦. 炎症肠病诊断治疗的最新进展[J]. 中国实用内科杂志, 2000, 20 (1): 17 - 19.

[2]

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges[J]. Gene, 2002, 285(1 - 2): 1 - 24.

[3]

Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, et al. Foxp3 + regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease [J]. J Clin Immunol, 2010, 30(1): 80 - 89.

[4]

Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, et al. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel disease [J]. Am J Gastroenterol, 2001, 100(1): 64 - 72.

[5]

于小凤, 吕行政, 董委波. 黄芩汤治疗溃疡性结肠炎临

- 床观察[J]. 中国中医急症, 2010, 19(9): 1510.
- [6] 陈芳, 张波, 唐立尧. 黄芩提取物治疗大鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 沈阳部队医药, 2006, 19(4): 230-231.
 - [7] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 中华内科杂志, 2008, 1(47): 73-79.
 - [8] 孙菁, 袁耀宗. 肠易激综合征: 罗马Ⅲ标准与我国共识意见解读[J]. 医学与哲学, 2008, 29(6): 12-14.
 - [9] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 139-143.
 - [10] Bacon CM, Petricoin EF, Ortaldo JR, et al. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(4): 7307-7311.
 - [11] Jacobson NG, Szabo SJ, Weber Nordt RM, et al. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and STAT4[J]. J Exp Med, 1995, 181(1): 1755-1762.
 - [12] Pang YH, Zheng CQ, Yang XZ, et al. Increased expression and activation of IL-12-induced STAT4 signaling in the mucosa of ulcerative colitis patients[J]. Cell Immunol, 2007, 248(2): 115-120.
 - [13] Nishikomori R, Ehrhardt RO, Strober W. T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of interleukin 12 receptor beta2 chain expression and signaling[J]. Exp Med, 2000, 191(3): 847-858.
 - [14] Nishikomori R, Gurunathan S, Nishikomori K, et al. BALB/c mice bearing a transgenic IL-12 receptor beta2 gene exhibit a nonhealing phenotype to Leishmania major infection despite intact IL-12 signaling[J]. J Immunol, 2001, 166(11): 6776-6783.
 - [15] Coskun M, Salem M, Pedersen J, et al. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Pharmacol Res, 2013, 76: 1-8.
 - [16] 庞艳华, 郑长青. STAT4 在溃疡性结肠炎中的表达及意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(3): 305-307.
 - [17] Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, et al. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(1): 64-72.
 - [18] 赵佳, 沈霖, 王凤林, 等. 复方苦参结肠溶胶囊对溃疡性结肠炎患者肠黏膜 NF- κ B 及 STAT6 活化的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1884-1886.
 - [19] 张建林, 高鹏, 翟春涛. 自拟肠僻方治疗溃疡性结肠炎 60 例疗效观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(12): 888-889.
 - [20] 丁晓刚, 傅延龄. 黄芩汤有效成分配方对大鼠实验性溃疡性结肠炎的免疫调节作用[J]. 中医药学刊, 2003, 21(1): 126.
 - [21] Jung SH, Kang KD, Ji D, et al. The flavonoid baicalin counteracts ischemic and oxidative insults to retinal cells and lipid peroxidation to brain membranes[J]. Neurochem Int, 2008, 53(5): 325-337.
 - [22] Chou TC, Chang LP, Li CY, et al. The anti-inflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia[J]. Anesth Analg, 2003, 97(3): 1724-1729.
 - [23] 郑学宝, 封艳玲, 刘洪波, 等. 黄芩汤对湿热型溃疡性结肠炎大鼠 CD4⁺ T 细胞及其共刺激分子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 169-172.
 - [24] 李林, 曾耀英, 黄秀艳. 黄芩苷对不同刺激剂诱导的小鼠 T 淋巴细胞体外活化的影响[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1188-1191.

(收稿: 2013-06-17 修回: 2014-08-17)