

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2012.05.006

健脾清热解毒化瘀方对大鼠实验性溃疡性 结肠炎细胞因子的影响

陈 宇¹, 林一帆^{1△}, 王长洪¹, 高文艳¹, 巩 阳¹, 刘 杨¹,
雷春红¹, 季 芳¹, 王 洋², 陆宇平¹

(¹ 沈阳军区总医院 中医科, 国家中西医结合消化病重点学科, 辽宁 沈阳 110840;

² 沈阳军区总医院 动物实验科, 辽宁 沈阳 110840)

摘要:[目的]探讨以益气健脾、清热解暑、活血化瘀为原则组成方剂对溃疡性结肠炎(UC)大鼠细胞因子的影响,探讨其治疗 UC 的机制。[方法]除 15 只大鼠作为正常组外,其他大鼠采用 TNBS 复制 UC 模型后随机分成模型组、对照组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组、中药组,肉眼及镜下观察各组大鼠的组织学损伤,并检测血清中细胞因子的含量。[结果]中药组、SASP 组在减轻肉眼及镜下的组织学损伤方面和改善细胞因子方面较模型组、对照组均具有明显效果($P < 0.05$);中药组较 SASP 组疗效更明显($P < 0.05$)。[结论]以益气健脾、清热解暑、活血化瘀为原则组成方剂对 UC 治疗有效,其机制可能是提高抗炎因子的含量,降低炎症因子的含量,维持细胞因子之间的平衡,进而调节免疫炎症反应。

关键词:结肠炎,溃疡性; 益气健脾; 清热解暑; 活血化瘀; 细胞因子

中图分类号:R 574.62 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-038X(2012)05-0208-04

Experimental study of the method of strengthening the spleen and supplementing qi, clearing away heat and toxicant, resolving blood-stasis and unblocking collaterals on the cytokines in experimental rats with ulcerative colitis

CHEN Yu¹, LIN Yi-fan¹, WANG Chang-hong¹, GAO Wen-yan¹, GONG Yang¹,
LIU Yang¹, LEI Chun-hong¹, JI Fang¹, WANG Yang², LU Yu-ping¹

(¹ Traditional Chinese Medicine Department, General Hospital of Shenyang Military District, Shenyang 110840, China; ² Animal Experiments Department, General Hospital of Shenyang Military District, Shenyang 110840, China)

Corresponding author: LU Yu-ping, E-mail: luyuping@hotmail.com

Abstract: [Objective] To investigate the effects of Chinese formula of strengthening the spleen and supplementing qi, clearing away heat and toxicant, resolving blood-stasis and unblocking collaterals on cytokines of ulcerative colitis(UC) rat, and to explore the mechanism of its treatment of UC. [Methods] Except 15 rats as a normal group, other UC rat model by TNBS were randomized into model group, control group, liu nitrogen sulfa-drugs pyridine(SASP) group, traditional Chinese medicine group. Histologic damage and cytokines in serum were detected. [Results] Traditional Chinese medicine group and the SASP group had better effect in improving cells damage

收稿日期:2012-02-20

基金项目:沈阳军区总医院医药卫生科研基金资助(No:09Y-204)

作者简介:陈 宇,在读硕士研究生,主要从事中西医结合治疗消化病的研究

通讯作者:陆宇平, E-mail: luyuping@hotmail.com

△导师

and the histologic factor than the control group ($P < 0.05$); curative effect of traditional Chinese medicine group was better than SASP group ($P < 0.05$). [Conclusion] The balance of cytokines plays an important role in the pathogenesis of UC. The method of traditional Chinese treatment is effective, which may improve the anti-inflammatory factor content, reduce levels of inflammatory cytokines to maintain the balance among cytokines, thereby regulating the immune and inflammatory responses.

Key words: ulcerative colitis; strengthening the spleen and supplementing qi; clearing away heat and toxicant; resolving blood stasis and unblocking collaterals; cytokine

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因未明的直肠和结肠慢性非特异性炎症性疾病,久治不愈,易反复发作,已被 WHO 确认为现代难治病。流行病学资料提示,UC 的发病率无论在国内和国外都有逐年增长的趋势^[1-2]。目前治疗此病的西药主要为氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂,但都有不同程度的不良反应,且疗效并不理想。我们认为 UC 以脾虚为发病根本,热毒内蕴是发病的条件,瘀血阻络是病理产物,确立了以益气健脾、清热解毒、化瘀通络的基本治法,经临床反复实践组成了基本方,取得了很好的疗效^[3]。本实验主要观察以益气健脾、清热解毒、活血化瘀为原则组成方剂对 UC 大鼠结肠损伤的修复作用以及对细胞因子的影响,探讨其治疗 UC 的机制。

1 材料与方法

1.1 动物、药物及仪器

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 80 只,由本院动物实验科提供,体质量 220~260 g,8~10 周龄。

2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS):由 Sigma 公司提供,为 5%(W/V)水溶液,批号 31M5021。柳氮磺胺吡啶(SASP):上海三维制药有限公司,批号:1104020,加入蒸馏水,制成 0.1 g/ml 的 SASP 混悬液。中药:配方颗粒剂,广东一方制药有限公司,批号:1108070,由黄芪 30 g,肉桂 10 g,炮姜 10 g,败酱草 20 g,白头翁 15 g,黄连 10 g,白术 15 g,苍术 15 g,青黛 3 g,苦参 15 g,丹参 15 g,炙甘草 10 g 配成浓度 2.0 g/ml 的药液。

大鼠血清干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-10、表皮生长因子(EGF)酶联免疫吸附试剂盒,选自北京齐松生物有限公司。全自动离心机(北京吉安得尔科技有限公司)。自动酶标仪(北京众驰伟业科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 采用 spss17.0 统计分析软件(版本 17.0.0.236)按照体质量编号将 80 只 SD 大鼠随机分为 2 组,正常组 15 只,造模组 65 只。造模组造模

后 48 h 随机选取 6 只处死,将剩余存活的造模大鼠按体质量重新编号随机分成 3 组:对照组(13 只)、柳氮磺胺吡啶(SASP)组(16 只)、中药组(17 只)。

1.2.2 UC 大鼠模型复制 依照文献^[4]将大鼠造模前禁食 24h,自由饮水,造模时用水合氯醛(0.3 ml/kg)麻醉大鼠后,用橡胶输液管由肛门经缓插入深约 8 cm,以含 100 mg/kg TNBS 的 50%乙醇溶液缓慢推入结肠,将大鼠尾巴提起,持续倒置 30s,确保注入的 TNBS 能够在大肠中弥散分布。

1.2.3 给药剂量及方法 正常组、对照组以 0.9%氯化钠溶液灌胃,每次 2 ml。按照文献^[5]计算治疗药物的灌胃剂量:中药组给予益气健脾、清热解毒、化瘀通络的中药,灌胃剂量为 16.65 g/kg;SASP 组给予 0.1 g/ml 的 SASP 混悬液。各组每日均给药 1 次,连续治疗 14 d。

1.2.4 观察方法 模型组大鼠(6 只)于造模后 48 h、其他各组大鼠于实验后第 15 天,用 10%水合氯醛(0.3 ml/kg)麻醉后自眼球取血,离心取血清,应用酶联免疫吸附法检测血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、EGF 的含量,检测过程严格按照试剂盒操作说明进行操作;剖腹观察结肠外观及腹腔情况,应用放大镜肉眼观察肠黏膜急性损伤程度,同时进行结肠黏膜损伤情况评估;剪取病变最明显处 2 cm 长度,经苏木素染色后进行病理组织学损伤评估。

1.2.5 损伤指标评估 ①结肠黏膜损伤情况:参照文献^[6]选择腹腔粘连和结肠溃疡及炎症变化作为指标对造模大鼠结肠黏膜损伤进行评分;②病理组织学损伤情况:参照文献^[7]对造模大鼠组织学损伤进行评估,组织学损伤程度用炎症、病变深度、肠隐窝损伤评分之和表示。

1.3 统计学处理方法

应用 SPSS 17.0 版软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组 t 检验。多个(≥ 3)组间的比较,数据服从正态分布且方差齐即采用单因素方差分析,服从正态分布但方差不齐,采用 Kruskal-Wallis 法秩和检验。

2 结果

2.1 造模各组大鼠结肠黏膜损伤情况评估

造模各组大鼠结肠黏膜损伤情况评估见表 1。

表 1 造模各组大鼠结肠黏膜损伤情况评估
分, $\bar{x} \pm s$

组别	只数	腹腔粘连	溃疡及炎症变化
模型组	6	1.66 ± 0.51	6.50 ± 1.05
对照组	13	1.69 ± 0.48	6.08 ± 1.03
SASP 组	16	1.44 ± 0.63 ¹⁾²⁾	4.43 ± 1.57 ¹⁾²⁾
中药组	17	1.29 ± 0.58 ¹⁾²⁾³⁾	3.58 ± 1.94 ¹⁾²⁾³⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与对照组比较,²⁾ $P < 0.05$; 与 SASP 组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 造模各组大鼠病理组织学损伤情况评估

造模各组大鼠病理组织学损伤情况评估见表 2。

2.3 各组大鼠血清细胞因子含量变化

各组大鼠血清细胞因子含量变化见表 3。

3 讨论

UC 是一种病因未明的直肠和结肠慢性非特异性炎症性疾病, 现在大量科研资料表明 UC 是由多种因素相互作用所致, 主要包括遗传、免疫和环境因素。近年来认为肠黏膜免疫紊乱在 UC 发病机制中

具有中心性地位, 其中一个极为重要的发病机制是炎症因子与抗炎因子平衡失调^[8-9], 在促炎因子中具有代表性的是 IL-1、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等, 抗炎因子中具有代表性的是 IL-4、IL-10、EGF 等。IL-10 主要生物学功能是抑制炎症反应和抑制促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-8、IL-1 β)的释放, 调节 T 细胞、B 细胞等多种免疫细胞的增殖和分化^[10-11]。肠道异常免疫反应导致细胞因子产生失调, 大量的促炎症细胞因子可直接损害肠道上皮, 致使肠黏膜屏障受损、通透性增加, 肠道菌群移位激活了肠道异常免疫反应^[12-13], IL-10 可以抑制炎症因子的产生, 保持肠道黏膜屏障的完整性, 防止 UC 的发生和恶化。EGF 参与保持胃肠道黏膜的完整和通过刺激多种细胞的分裂增殖, 修复胃肠道黏膜, EGF 升高促进肠上皮细胞、纤维母细胞及平滑肌细胞分裂、增生, 继而修复损伤的肠壁^[14]。TNF- α 是一种重要的促炎症因子和免疫调节因子, 由单核巨噬细胞和活化的 T 淋巴细胞分泌。引起肠道黏膜损伤的可能机制包括: 促进释放血小板活化因子、生成白三烯和氧自由基、诱导一氧化氮合成, 从而产生大量一氧化氮引起细胞损伤。IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌, 是强有力的吞噬细胞和中性粒细胞激活物。张志军等^[15]研究发现, 在硫酸葡聚糖钠诱导的急性 UC 小鼠模型肠黏膜中 TNF- α 、IFN- γ mRNA 的表达明显高于正常对照组, 说明在 UC 发病机制中, 可能是促炎因子表

表 2 造模各组大鼠病理组织学损伤情况评估

分 $\bar{x} \pm s$

组别	只数	炎症	病变深度	肠隐窝损伤	组织学损伤
模型组	6	2.83 ± 0.41	2.67 ± 0.47	3.33 ± 0.51	8.83 ± 0.98
对照组	13	2.15 ± 0.69	2.23 ± 0.43	2.15 ± 0.55	6.53 ± 1.19
SASP 组	16	1.56 ± 0.72	1.62 ± 0.81	1.87 ± 0.88	5.07 ± 1.02 ¹⁾²⁾
中药组	17	1.48 ± 0.61	1.29 ± 0.78	1.54 ± 0.77	4.75 ± 0.98 ¹⁾²⁾³⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与对照组比较,²⁾ $P < 0.05$; 与 SASP 组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠血清细胞因子含量变化

ng/L, $\bar{x} \pm s$

组别	只数	IFN- γ	TNF- α	IL-10	EGF
模型组	6	78.67 ± 2.16 ¹⁾	110.67 ± 2.16 ¹⁾	26.67 ± 4.97 ¹⁾	121.33 ± 1.97 ¹⁾
正常组	15	59.78 ± 3.06	101.93 ± 3.89	36.13 ± 4.22	128.33 ± 2.06
对照组	13	75.51 ± 2.64 ¹⁾	109.69 ± 3.01 ¹⁾	27.53 ± 2.96 ¹⁾	121.07 ± 2.10 ¹⁾
SASP 组	16	54.41 ± 2.87 ¹⁾²⁾	95.15 ± 2.88 ¹⁾²⁾	30.41 ± 3.31 ¹⁾²⁾	132.31 ± 2.27 ¹⁾²⁾
中药组	17	50.25 ± 2.38 ¹⁾²⁾³⁾	93.06 ± 2.43 ¹⁾²⁾³⁾	33.22 ± 3.67 ¹⁾²⁾³⁾	136.64 ± 2.87 ¹⁾²⁾³⁾

与正常组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与对照组比较,²⁾ $P < 0.05$; 与 SASP 组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

达增多、作用增强,从而产生一个异常的免疫应答反应,最终导致 UC 的发病。

中医文献无“溃疡性结肠炎”之病名,根据其临床表现,从历代典籍中关于“肠癖”“滞下”“泄泻”“痢疾”“便血”“肠风”“脏毒”等病证的论述中可以找到相关的辨证论治经验。目前中医学认为,UC 的病因多与六淫邪袭(尤其是湿热之邪)、饮食所伤、情志郁结及禀赋不足等有关,其病机多属本虚标实、虚实夹杂之证,但以本虚为主。其中脾虚为其发病之本,在中医界已基本达成共识^[16],我们前期的研究认为 UC 的病因病机不外乎 3 个方面:脾虚是发病的基础、热毒内蕴是发病的条件、瘀血阻络是病理产物,故治疗上采用益气健脾、清热解毒、化瘀通络的基本方法,以此为基础自拟成方。方中黄芪、白术益气健脾,肉桂、炮姜善暖脾胃、温中止痛,苍术辛香健脾,青黛、苦参、败酱草、白头翁、黄连清热解毒,丹参凉血活血、清热消痛。现代药理研究认为,黄芪能促进机体代谢、抗疲劳、增强和调节机体免疫功能,提高机体抗病能力,升高白细胞,增强网状内皮系统的吞噬作用,增强巨噬细胞活动,促进细胞免疫作用^[17],还具有较广泛抗菌作用。肉桂中含有桂皮油,能促进肠蠕动,排除消化道积气,缓解胃肠痉挛性疼痛。青黛、苦参、败酱草、白头翁等具有抗菌作用。黄连中含有小檗碱,具有抗炎、抗腹泻作用。丹参能改善血液流变性、降低血液黏度,还具有抗炎、抗过敏作用,对金黄色葡萄球菌、多种杆菌具有不同程度的抑制作用。结果表明,本方可明显改善以 TNBS 造成的大鼠 UC 模型的临床及病理变化,减轻腹腔粘连及炎症反应,减少组织学损失,调节细胞因子的平衡。在与模型组及对照组相比,本方在减轻肉眼及镜下组织学方面具有明显疗效,说明其临床治疗 UC 的有效性。在与 SASP 组的对比中发现,本方在减轻腹腔粘连、炎症反应和减少病理组织学损失方面疗效明显,说明中药治疗 UC 的优势。在细胞因子方面,本方与模型组及对照组相比,IL-10、EGF 的含量明显提高,TNF- α 、IFN- γ 的含量明显降低,说明本方可能具有调节细胞因子平衡的功能。与 SASP 组相比,本方在 IL-10、EGF 的含量提高、TNF- α 、IFN- γ 的含量降低方面较其稍明显,说明 SASP 与本方都可能具有调节细胞因子平衡的功能,但本方稍好于 SASP。因此临床上治疗 UC 应从多种途径入手,才能取得良好的疗效。本方治疗 UC 的机制可能与提高抗炎因子的含量,降低炎症因子的含量,维持细胞因子之间的平衡,保持肠道黏膜屏障的完整性有关。

参考文献

- [1] 江学良,崔慧斐. 溃疡性结肠炎[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:1-38.
- [2] 周 玫. 非特异性溃疡性结肠炎中西医结合诊治研究进展[J]. 中西医结合杂志,1988,8(3):184-184.
- [3] 陆宇平,王长洪,王立新,等. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2008,16(2):91-93.
- [4] 王 皓,欧阳钦,胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立[J]. 胃肠病学,2001,6(1):7-10.
- [5] 陆宇平,王长洪,林一帆,等. 健脾清热解毒化瘀法治疗溃疡性结肠炎大鼠的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(9):1483-1485.
- [6] BUTZNER J D, PARMAR R, BELL C J, et al. Butyrate therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat[J]. Gut, 1996, 38: 568-573.
- [7] RAVI B, PRAVEEN A, ROHINI H, et al. Ulcerative Colitis associated with Takayasu arteritis[J]. Int J Cardiol, 2003, 88: 91-93.
- [8] BAMIAS G, NYCE M R, DE LA RUE S A, et al. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease[J]. Ann Intern Med, 2005, 143: 895, 904.
- [9] HIBI T, OGATA H. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease[J]. J Gastroenterol, 2006, 41: 10-16.
- [10] 庞艳华,郑长青,王铁淳,等. IL-4 和 IL-13 在溃疡性结肠炎中的表达[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2005,14(4):410-412.
- [11] 严 瑾,欧阳钦,刘卫平,等. 肿瘤坏死因子- α 在溃疡性结肠炎中的作用[J]. 中华内科杂志,2001,40(4):266-267.
- [12] KENNEDY R J, KIRK S J, GARDINER K R. Mucosal barrier function and the commensal flora[J]. Gut, 2002, 50: 441-442.
- [13] DHARMANI P, CHADEE K. Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immunesystem and the cross talk with gastrointestinal mucosahold the key[J]. Curr Mol Pharmacol, 2008, 1: 195-212.
- [14] 吴友胜,杨 军,许立天. Graves'病患者血清表皮生长因子水平的变化[J]. 放射免疫学杂志,1997,10(4):231-232.
- [15] 张志军,刘 懿,王 磊. TLR4mAb 对急性期溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜中促炎因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 的影响[J]. 复旦学报,2008,35(3):176-180.
- [16] 柳 雯,王翼洲,车富强. 中医药治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 安徽医药,2010,14(9):1096-1097.
- [17] 傅志泉,金业成. 萎缩性胃炎的中医证治[J]. 实用中西医结合杂志,1996,9(11):655-655.