

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.05.01

清热解毒法与益气健脾法对急性期和慢性期 溃疡性结肠炎大鼠 NO 的影响

李文静, 林 燕

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

摘要: [目的] 阐明益气健脾法和清热解毒法对急性期和慢性期溃疡性结肠炎的影响, 为辨证治疗提供依据。 [方法] 检测溃疡性结肠炎大鼠血清 NO 水平, 通过观察不同治法的治疗效果探讨其治疗 UC 的抗炎及免疫机制。 [结果] 造模完成后, 模型组急性期血清 NO 水平显著高于正常组 ($P < 0.01$), 慢性期有降低趋势 ($P < 0.01$), 但仍显著高于正常组 ($P < 0.01$)。在急性期, 血清 NO 水平清热解毒组显著低于模型组 ($P < 0.01$), 且与正常组无统计学差异; 益气健脾组、西药组高于正常组 ($P < 0.01$); 在慢性期, 清热解毒组、益气健脾组、西药组均低于模型组 ($P < 0.05$), 其中益气健脾组显著低于模型组 ($P < 0.01$), 也低于清热解毒组和西药组 ($P < 0.05$); 益气健脾组 NO 水平慢性期显著低于其急性期 ($P < 0.01$)。 [结论] 免疫损伤和炎症反应持续存在于 UC 全病程, 急性期尤为突出, 慢性期虽然有所减轻但仍然存在。急性期 UC 以标实为主, 湿热瘀毒为其主要病机, 所以清热解毒法能更好地发挥抗炎作用, 取得明显疗效。慢性期, 以正虚为主, 正气不足, 邪气衰弱, 益气健脾法通过提高免疫力来改善免疫损伤情况, 达到更好的治疗效果。这为 UC 的辨证论治提供客观依据。

关键词: 溃疡性结肠炎; 一氧化氮; 益气健脾; 清热解毒

中图分类号: R574.62

文献标志码: A

文章编号: 1671-038X(2015)05-0303-04

The influence of Qingrejiedu Therapy and Yiqijianpi Therapy on the level of NO in serum of ulcerative colitis rats during acute and chronic phase

LI Wen-jing, LIN Yan

(School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Corresponding author: LIN Yan, E-mail: yanlin77211@163.com

Abstract: [Objective] To clarify the effect of Qingrejiedu Therapy and Yiqijianpi Therapy on serum NO of acute and chronic ulcerative colitis rats, and to provide the basis for syndrome differentiation treatment. [Methods] Serum NO level of ulcerative colitis rats was detected. The curative effects of different treatment were observed to explore the anti-inflammatory and immune mechanisms for the treatment of UC. [Results] serum NO level of the model group was significantly higher than that of normal group ($P < 0.01$) during acute phase, which was decreased during chronic phase ($P < 0.01$), but still significantly higher than normal group ($P < 0.01$). In the acute phase, serum NO level of Qingrejiedu Therapy group was significantly lower than model group ($P < 0.01$), and had no statistical difference compared with normal group. NO level was higher in Yiqijianpi Therapy group and western medicine group compared with normal group ($P < 0.01$). In the chronic phase, NO level was lower in Qingrejiedu Therapy group, Yiqijianpi Therapy group and the western medicine group compared with model group ($P < 0.05$). However, the level of NO was obviously lower in Yiqijianpi Therapy group compared with model group, which was also lower than Qingrejiedu Therapy group or western medicine group ($P < 0.01$). Yiqijianpi Therapy group had a significantly lower NO level in chronic stage than its acute stage ($P < 0.01$). [Conclusion] The im-

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No: 81202682)

作者简介: 李文静, 在读医学硕士, 从事中医基础理论研究

通讯作者: 林 燕, E-mail: yanlin77211@163.com

mune and inflammation injury continues to exist in the whole course of UC, especially in acute stage. Excessive Biao of dampness and stasis is the main pathogenesis for acute phase UC, thus Qingrejiedu Therapy can play a better anti-inflammatory effect and achieve significant results. In chronic phase, the main pathogenesis is the weakness of vital qi, thus Yiqijianpi Therapy can improve the immunity to promote immune damage and achieve better therapeutic effect. This provides the objective basis for the syndrome differentiation and treatment of UC.

Key words: Ulcerative colitis; nitric oxide; Yiqijianpi; Qingrejiedu

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因不明,主要累及直结肠的黏膜及黏膜下层,形成浅表性溃疡、非特异性炎症等病变的消化道疾病。临床表现以黏液脓血便、腹痛腹泻、里急后重为主。本病病程缓慢,易反复发作,治愈难度大,是国内外医学界研究的重点。中医学根据 UC 在不同时期有不同的临床表现和病机而辨证施治,不同时期采用不同的疗法,可产生较好的疗效。益气健脾法和清热解毒法是 UC 临床常用的治疗方法,探讨益气健脾法和清热解毒法对 UC 不同时期的临床疗效、疗效机制及应用规律是本课题研究重点。现代研究认为 NO 可作为监测 UC 活动性的生物指标^[1]。

本实验选用免疫复合法制备^[2-3] UC 大鼠模型,大鼠病变时期可长达 6~8 周,造模后的前 2 周可见大鼠出现黏液脓血便、食欲不振、拱背拖尾等现象,病理切片显示黏膜层脱落或浅层结构消失、坏死形成溃疡,腺体被破坏,黏膜及黏膜下层肿胀严重,血管扩张,充满血液,且有大量炎症细胞浸润等急性炎症损伤现象。造模 3 周后,大鼠黏液脓血便逐渐消失,但仍有稀便、软便,精神不振、喜扎堆等现象,病理切片可见溃疡周围的黏膜上皮和腺体增生,或被肉芽组织取代,肠黏膜内仍有炎性细胞浸润,但在逐渐消退,腺体排列紊乱,黏膜下层可见含铁血黄素沉积,血管内皮肿胀,肌层增厚等慢性炎症现象。实验分别选取处于急性期的造模后第 2 周的大鼠和处于慢性期的造模后第 6 周的大鼠,检测其血清 NO 水平,以探讨清热解毒法和益气健脾法治疗 UC 的作用机制及疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:清洁级健康 Wistar 大鼠 120 只,雄性,体重 180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(动物许可证号 SCXK(京)2012-0001);清洁级健康大耳白家兔 12 只,体重约 2 kg,由北京海淀区兴隆实验动物养殖厂提供(动物许可证号 SCXK(京)2011-0006)。

试剂:三硝基苯磺酸(TNBS)(sigma 公司)、完全弗氏佐剂(sigma 公司)、3.5%水合氯醛、BCA 蛋

白定量试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)、NO 检测试剂盒(普利莱基因技术有限公司)等。

药物:中药购于北京同仁堂药店。西药,美沙拉嗪肠溶片,0.25×24 片/盒,由葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司生产,批准文号为国药准字 H1998014。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 采用结肠黏膜组织致敏加 TNBS-乙醇的免疫复合法制备 UC 大鼠模型。造模进程减少可见大鼠精神不振、毛色暗淡、喜扎堆、自主活动减少等情况。造模完成后第二天,大鼠出现黏液便、脓血便、稀便等情况,有拱背、拖尾等现象,解剖可见结肠有脓血、脓液、溃疡、肠梗阻、肠壁粘连增厚等情况。

1.2.2 分组设计与给药 120 只 wistar 大鼠随机分成正常组、模型组、清热解毒组、益气健脾组和西药组,其中正常组和模型组各 30 只,其余三组各 20 只。模型成功后第 1 天开始,每组以相应的中西药物灌胃给药,正常组、模型组用洁净水灌胃,每日 1 次。清热解毒组用以芍药汤为代表的加减组方,将药物煎汤后浓缩为生药量 1.46 g/ml。益气健脾组用黄芪四君子汤为代表加减组方,将药物煎汤后浓缩为生药量 1.55 g/ml。西药组用美沙拉嗪肠溶片研碎,将其配成 0.0234 g/ml 混悬液。灌胃剂量均依据成人临床拟用量,通过体表面积换算得出,每 100 g 大鼠给 1 ml 药量。

1.2.3 取材检测 于造模后第 1 天在正常组和模型组中各随机选择 10 只取材,再分别于给药后第 2 周末和第 6 周末每组随机选择 10 只取材。以 3.5%水合氯醛腹腔麻醉后解剖,腹主动脉采血,离心取血清,用 NO 检测试剂盒检测血清中 NO 的含量,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,组间采用 LSD 法进行两两比较,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时期非给药组大鼠血清 NO 浓度的变化

正常组在 3 个不同时期基本无变化;造模后第 1 天,与正常组比较,模型组明显升高($P < 0.01$);造

模后 2 周(急性期)、6 周(慢性期)模型组仍然明显高于正常组($P < 0.01$);但是随着时间的推移,NO 水平逐渐减小,且有统计学差异($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组大鼠血清 NO 浓度比较

组别	成模后第 1 天	第 2 周	第 6 周
正常组	7.7881 ± 1.5259 ¹⁾	7.2535 ± 1.3371 ⁴⁾⁸⁾¹⁰⁾	7.2363 ± 1.3675 ⁴⁾⁵⁾⁹⁾
模型组	15.1207 ± 0.9998 ²⁾¹¹⁾	13.6899 ± 1.3922 ²⁾⁶⁾	12.8041 ± 1.3624 ²⁾⁵⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾
清热解毒组		8.4175 ± 0.9649 ⁴⁾⁸⁾	10.0420 ± 1.9695 ¹⁾³⁾⁷⁾
益气健脾组		11.9286 ± 2.5294 ²⁾⁶⁾¹¹⁾	7.4354 ± 1.0758 ⁴⁾⁵⁾⁹⁾¹¹⁾
西药组		11.2619 ± 1.4709 ²⁾	10.1021 ± 0.8808 ¹⁾³⁾⁷⁾

与同时期正常组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与同时期模型组比较,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与同时期清热解毒组比较,⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与同时期益气健脾组比较,⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$;与同时期西药组比较,⁹⁾ $P < 0.05$,¹⁰⁾ $P < 0.01$,与同组不同时期比较¹¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 给药 2 周后(急性期)不同药物对 UC 大鼠血清 NO 浓度的影响

给药 2 周后,与模型组比,清热解毒组的水平明显下降,且有显著统计学差异($P < 0.01$),益气健脾组和西药组有下降趋势,但无统计学差异;与正常组比,清热解毒组接近于正常值,差异无统计学意义,益气健脾组和西药组仍明显高于正常值,差异有统计学意义($P < 0.01$);清热解毒组低于益气健脾组和西药组,且与益气健脾组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 给药 6 周后(慢性期)不同药物对 UC 大鼠血清 NO 浓度的影响

给药 6 周后,与模型组比,3 个给药组的水平均明显降低,且差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与正常组比,益气健脾组接近于正常值,差异无统计学意义,清热解毒组与西药组有接近正常值的趋势,但仍高于正常值,差异有统计学意义($P < 0.05$);益气健脾组低于清热解毒组和西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 相同药物对不同时期 UC 大鼠血清 NO 浓度的影响

清热解毒组慢性期有高于其急性期的趋势,但无统计学差异;益气健脾组慢性期低于其急性期,且差异有统计学意义($P < 0.01$);西药组慢性期有低于其急性期的趋势,但差异无统计学意义。

3 讨论

NO 是体内发现的第一个气体信息分子,参与体内众多的生理病理过程,它是生物体内重要的信使分子和效应分子的小分子物质,由 L-精氨酸在一

氧化氮合成酶催化下逐步生成。NO 作为体内重要的生物信使分子,参与炎症与组织的损伤,在消化、循环、免疫等全身多系统的生理、病理及有关的临床疾病中起着重要的作用^[4]。研究证实 UC 患者血清 NO 水平明显增高,并与 UC 的病情呈正相关改变,提示血清 NO 水平的变化可反应 UC 病变的活动情况^[5-6]。它在 UC 发病机制中可能的作用是:①NO 合成过程中,伴有超氧阴离子 O_2^- 产生,二者可转化成具有很强生物氧化性的自由基,通过自由基链式反应导致含羟基蛋白和脂质氧化造成组织损伤;②NO 可启动免疫防御系统如巨噬细胞、中性粒细胞、抑制靶细胞内 DNA 复制,若作用过强则造成自身正常组织损伤^[7];③NO 可通过促进血管扩张、增强血管通透性和渗漏、介导产生细胞毒性、诱导促炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-1 产生等渠道促进炎症产生和加重^[8]。

3.1 初步明确溃疡性结肠炎病理机制

免疫损伤和炎症的存在贯穿 UC 病程的始终,在 UC 急性期明显,在慢性期虽然影响有所降低但仍持续存在,难以恢复正常,这种病理现象使受伤的肠黏膜难以修复,这可能是引起 UC 病程长、迁延难愈、反复发作的病理机制。

3.2 证实清热法能有效缓解 UC 急性期症状

在 UC 急性期,清热解毒组血清 NO 浓度趋近接近正常值,效果明显优于益气健脾组和西药组。UC 急性期因湿热蕴结,热毒壅滞,化为脓血,血瘀气滞,造成肠道湿阻、热结、气滞、血瘀,而致肠络失和、血败肉腐、下痢赤白。清热解毒方针对 UC 急性期病因病机,以赤芍清热凉血、祛瘀止痛,白芍敛阴

养血、安中止痛为君药。黄连、黄芩清热燥湿、厚肠止痢；木香、焦槟榔行气导滞，共为臣药。当归助芍药养血益阴、行血活血；连翘清热解毒、消痈散结，为疮家圣药；焦三仙消食化积、安中和胃。上药共为佐使，增强清热解毒、活血导滞的功效。此方可明显改善急性期 UC 大鼠的一般状况，减轻肠黏膜的炎症，抑制免疫损伤。

3.3 证实益气健脾法治疗 UC 慢性期有良好效果，能有效地抗复发

在 UC 慢性期，各用药组均可见 UC 大鼠血清 NO 浓度下降、炎症反应的减少和一般状况的好转，但益气健脾组血清 NO 浓度最接近正常值，而清热解毒组和西药组与正常值有显著差异。UC 发展到慢性期，余邪未尽，正气受损，脾胃虚弱，运化无力，气虚血瘀，故倦怠乏力、时泻时止。益气健脾方以炙黄芪益气补中，生黄芪托疮生肌，共为君药。党参、白术甘温补气、健脾养胃，茯苓甘淡利湿、健脾止泻，共为臣药。当归养血和血，木香行气调中止痛，焦三仙消食导滞，炙甘草甘温益气、调和诸药，共为佐使。由此可见，在以脾虚为本的慢性期，益气健脾方可有效针对其正气不足、余邪未尽的病机，减轻症状，改善肠黏膜的级联损伤，降低复发率。

3.4 证实辨证施治对 UC 取得更好疗效的重要性

从数据可知，在急性期取得较好疗效的清热解毒法，在慢性期的疗效不佳，其血清 NO 浓度还有增高的趋势；益气解毒法在急性期无显著疗效，而在慢性期效果最好。这是因为 UC 不同时期的病机不同，只有辨证论治针对病机选择治疗方法，确立方药才能取得最佳疗效。这说明了辨证论治的重要性，若不辨明病机，则很难有疗效，甚则会加重病情。

由此可知，免疫损伤和炎症的存在贯穿 UC 病程的始终，相互影响、互为因果，这可能是 UC 难以

治愈、反复发作的原因。在急性期，清热解毒法可有效减轻免疫损伤和炎症，且优于西药组；在慢性期，益气健脾法可增强免疫力，改善 UC 肠黏膜的级联损伤，降低复发率，效果优于西药组。可见，UC 治疗应根据其不同时期的不同病机，正确选择相应的治疗方法与方药，辨证论治以提高治愈率、降低复发率。这为 UC 的辨证论治提供客观依据。

参考文献

- [1] AVDAGIĆ N, ZAĆIRAGIĆ A, BABIĆ N, et al. Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2013, 13:5-9.
- [2] 宫健伟, 苑述刚, 阮时宝. 对免疫方法制作溃疡性结肠炎动物模型的探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2005, 11(2):70-71.
- [3] 段 征, 汪维伟, 姜蓉. 两种溃疡性结肠炎大鼠模型比较[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(1):66-68, 72.
- [4] TRIPP M A, TEPPERMAN B L. Role of calcium in nitric oxide-mediated injury to rat gastric mucosal cells[J]. *Gastroenterology*, 1996, 111:65-71.
- [5] SOHN J J, SCHETTER A J, YFANTIS H G, et al. Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and senescence in inflammatory bowel disease[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e44156.
- [6] 杨依祚, 郝洪升, 颜晓晴. 溃疡性结肠炎患者血清中 VEGF、NO 的表达及其相互关系[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2010, 48(1):113-115.
- [7] 陈 吉. 一氧化氮与溃疡性结肠炎[J]. *国外医学(内科学分册)*, 1996, 23(8):323-325, 329.
- [8] ZHU L, GUNN C, BECKMAN J S. Bactericidal activity of per-oxyntrite[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 298:452-457.