

# 黛黄芍药散对放射性直肠炎大鼠 COX-2、TXB<sub>2</sub> 及 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 的影响

王毓国 窦永起 秦丽

**【摘要】 目的** 通过动物实验,研究中药复方黛黄芍药散在抑制微血管血栓形成、改善肠道微循环方面对放射性直肠炎的作用机制。**方法** 选用雌性 Wistar 大鼠 60 只,随机分为 6 组:空白对照组、模型组、地塞米松组及黛黄芍药散高、中、低剂量组,用<sup>60</sup>Co-γ 射线单次盆腔照射制作大鼠放射性直肠炎模型,各组给予相应药物干预,在照射后第 14 天给药 12 小时后处死大鼠,取直肠进行免疫组化检测其环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达,采用酶联免疫吸附试验检测各组血清中血栓素 B<sub>2</sub> (thromboxane B<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>)、6-酮-前列腺素 (6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub>, 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>) 的浓度,并计算 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 比值。**结果** 照射后第 14 天,模型组大鼠 COX-2、TXB<sub>2</sub> 含量及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 比值明显升高,而黛黄芍药散各剂量组中上述指标明显低于模型组 ( $P<0.01$ )。**结论** 黛黄芍药散可有效抑制放射性直肠炎大鼠肠道微血管血栓生成,改善微循环,其作用机制可能是通过控制 COX-2 的表达,从而减少 TXB<sub>2</sub> 的合成与释放,进而调节 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 比值。

**【关键词】** 黛黄芍药散; 放射性直肠炎; 环氧化酶 2; 血栓素 B<sub>2</sub>; 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.09.003

**Effect of Daihuang Shaoyao powder on COX-2, TXB<sub>2</sub> and 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> in rats with radiation proctitis** WANG Yu-guo, DOU Yong-qi, QIN Li. Traditional Chinese Medicine Department of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: DOU Yong-qi, E-mail: dyqi\_301@yeah.net

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of Daihuang Shaoyao powder on inhibiting

---

基金项目: 全军后勤科研计划(AWS14C014)

作者单位: 100853 北京,中国人民解放军医学院[王毓国(硕士研究生)、窦永起、秦丽(硕士研究生)]

作者简介: 王毓国(1991-), 2014 级在读硕士研究生。研究方向: 放射性直肠炎的基础与临床研究。E-mail: wangyuguo301@163.com

通讯作者: 窦永起(1965-), 硕士, 教授, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 中医药治疗恶性肿瘤。E-mail: dyqi\_301@yeah.net

thrombosis and improving the intestinal microcirculation in the rat model of radiation proctitis. **Methods** Sixty Wistar female rats were randomly divided into 6 groups, normal group, model group, dexamethasone group, high, medium and, low dosage of *Daihuang Shaoyao* powder groups. Rat models of radiation-induced proctitis were produced by  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray radiation. The levels of COX-2, TXB<sub>2</sub>, 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  and TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  were detected after drugs intervention for 14 days. **Results** Compared with the model group, the levels of COX-2, TXB<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  were obviously decreased in high dosage of *Daihuang Shaoyao* powder ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, *Daihuang Shaoyao* powder groups could effectively reduce the level of COX-2, TXB<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Daihuang Shaoyao* powder could effectively inhibit the formation of intestinal microvascular thrombosis, improve microcirculation, and the mechanism of action may be through controlling the expression of COX-2, which can reduce the synthesis and release of TXB<sub>2</sub>, and then adjust the ratio of the TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> .

**【Keywords】** *Daihuang Shaoyao* powder; Radiation-induced proctitis; Cyclooxygenase-2; Thromboxane B<sub>2</sub>; 6-keto-prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub>

研究表明<sup>[1]</sup>,血小板增多及功能亢进易导致肠炎加重,其原因有两方面:一为血小板的激活、聚集促进微血管血栓形成,阻塞血管,导致微循环功能障碍,加重肠黏膜缺血缺氧,引起进一步损伤;另一方面血小板功能亢进导致更多炎症因子的释放,加速炎症反应,形成恶性循环<sup>[2-3]</sup>。其中环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、血栓素 B<sub>2</sub> (thromboxane B<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>) 及 6-酮-前列腺素 (6-keto-prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub> , 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> ) 在血小板聚集、活化,血栓形成并加重炎症反应等整个炎症反应过程中具有重要作用。COX-2 是将花生四烯酸催化合成 TXB<sub>2</sub> 和 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  的关键限速酶,能使炎症不断放大<sup>[4]</sup>。TXB<sub>2</sub> 与 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  两者之间的动态平衡是调控血管壁紧张度、血小板功能及血管壁细胞迁移生长、止血及防止血栓形成和调节局部血流的重要因素。

课题组通过前期动物实验,证明了黛黄芍药散可减少核转录因子  $\kappa\text{B}$  (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ) 及相关炎症信号因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的表达,进而减轻炎症反应,本文以炎症反应的重要影响因素——微血管血栓形成为着眼点,探讨黛黄芍药散在抑制微血管血栓形成、改善微循环方面,对放射性直肠炎的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验动物为清洁级 Wistar 大鼠 60 只,雌性,体重 180 ~ 220 g,由军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK-(军)2012-0004,动物饲养于光、暗各 12 小时,恒温、恒湿的安静饲养室内。

### 1.2 药物及给药方法

黛黄芍药散组方:青黛 10 g、黄连 10 g、黄柏 10 g、牡丹皮 15 g、赤芍 20 g、血竭胶囊 3 g,均购自中国人民解放军总医院中药房,经鉴定后,煎煮 2 次,经过滤、旋转蒸发、浓缩,按成人临床等效剂量(体表面积法折算)的 1、2、4 倍,分别配置成含中药 0.68 g/mL、1.36 g/mL、2.72 g/mL 的药液,4℃ 冰箱避光密封保存。取雌性 Wistar 大鼠 60 只,适应性喂养 3 天后,随机分为:空白对照组、模型组、地塞米松组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组,每组 10 只。各组均于照射后次日开始灌胃,每天 1 次,连续 14 天。空白对照组、模型组均给予生理盐水 10 mL/kg 灌胃,地塞米松组给予地塞米松溶液 1.2 mg/kg 灌胃,中药低、中、高剂量组分别按相应浓度给予黛黄芍药散药液灌胃 2 mL。

### 1.3 实验仪器及试剂

$^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  照射装置(军事医学科学院放射医学与辐射防护医学研究所提供),离心机(Sigma, 1-15k), OLYMPUS BX51 显微镜,Image J1.48v 图像分析系统。COX-2 一抗试剂盒(博奥森,批号:bs-10411R),二抗试剂盒(中杉金桥,批号:15155A09),TXB<sub>2</sub> 试剂盒(美国 Andygene 公司,批号:HTLL30420),6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  试剂盒(美国 Andygene 公司,批号:HTLN30143),3% 戊巴比妥钠(德国,批号:k2208)。

### 1.4 模型制备

各照射组大鼠于照射前 8 小时禁食,除空白对照组外,其余组大鼠使用 3% 戊巴比妥麻醉,待大鼠肌肉完全松弛后,以仰卧体位将其四肢固定于特制照射板上,并置于距离  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  源中心 3 m、高 1 m 的照射台上,照射野自耻骨联合至肛门,照射野面积 3 cm×4 cm,其余部位用厚 5 cm 的铅砖屏蔽。采用一

次性照射,总剂量为 30 Gy,剂量率 165.32 cGy/min,照射时间为 18 分 12 秒,空白对照组大鼠置相似环境中,但不予照射,以造模后大鼠出现稀便、黏液便或柏油样便判定造模成功<sup>[5]</sup>,本实验造模成功 49 只,成功率 98%。

1.5 取材及标本处理

照射第 14 天给药 12 小时后,以 3% 戊巴比妥钠行大鼠腹腔麻醉,取血后剖取肛门以上 3 cm 直肠组织,沿纵轴剪开,生理盐水清洗净,肉眼观察其形态学变化。

1.6 大鼠直肠 COX-2 测定

采用免疫组化法检测直肠组织中 COX-2 的表达。每张切片随机选取 6 个视野,显微镜下采集图像,并用 Image J1.48v 图像分析系统进行阳性显色的平均积分光密度测定,取其均值作为平均光密度数值。

1.7 TXB<sub>2</sub>、6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 含量的 ELISA 法检测

于腹主动脉取血 5 mL,滴入试管中,不抗凝,置室温静置 2 小时后,将其放入离心机中,4℃、3000 rpm,离心 15 分钟,取上清液,采用 ELISA 法测定血清中 TXB<sub>2</sub> 及 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 浓度。

1.8 统计学处理

所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,COX-2、TXB<sub>2</sub>、6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 等数值经正态性及方差齐性检验后采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK 法检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,以  $P < 0.01$  为差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠直肠肉眼观察比较

正常对照组:肉眼可见大鼠直肠表面光滑,纹理清晰,未见出血点、糜烂及溃疡。模型组:直肠皱壁形态不规则,充血明显,大量点状瘀斑形成,部分糜烂。地塞米松组:直肠黏膜中度水肿,肠壁增厚,偶见糜烂及溃疡。中药中剂量组:直肠形态欠规则,黏膜轻度水肿,肠腔变窄,少量溃疡形成。中药低、高剂量组:直肠黏膜结构较完整,点状瘀斑不明显。

2.2 黛黄芍药散对放射性直肠炎大鼠组织 COX-2 的影响

结果显示:直肠组织中 COX-2 表达主要位于细胞胞浆中,呈弥漫性的棕黄色颗粒,在空白对照组中表达量较少,而在各造模组中直肠组织炎症区域

的细胞中表达更为明显。统计分析表明:与空白对照组相比,模型组 COX-2 表达量明显升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,各给药组 COX-2 表达量呈现不同程度的降低( $P < 0.01$ ),其中以地塞米松组、中药低剂量及高剂量组下降最为显著;各中药组与地塞米松组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠直肠 COX-2 的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	COX-2
空白对照组	10	0.14±0.02
模型组	9	0.27±0.01 <sup>b</sup>
地塞米松组	10	0.18±0.01 <sup>ac</sup>
中药高剂量组	10	0.18±0.01 <sup>c</sup>
中药中剂量组	10	0.20±0.02 <sup>ac</sup>
中药低剂量组	10	0.18±0.02 <sup>c</sup>

注:与空白对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

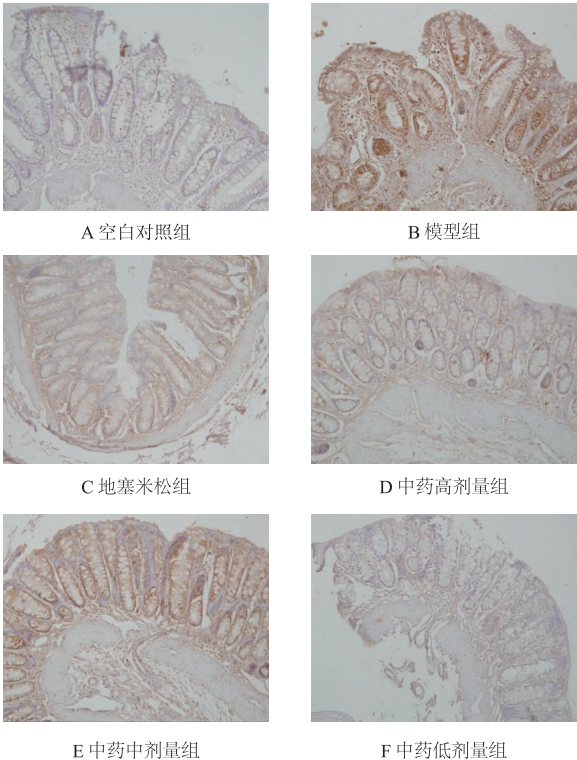


图 1 各组大鼠直肠 COX-2 免疫组化检测结果( $\times 400$ )

2.3 黛黄芍药散对放射性直肠炎大鼠 TXB<sub>2</sub>、6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 浓度及其比值的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠血清 TXB<sub>2</sub> 浓度及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 比值明显升高( $P < 0.01$ ),6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 浓度明显降低( $P < 0.01$ ),提示放射性直肠炎可引起大鼠血清中 TXB<sub>2</sub> 及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-



表 2 各组大鼠血清中 TXB<sub>2</sub>、6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 浓度及其比值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TXB <sub>2</sub> (ng/L)	6-Keto-PGF <sub>1α</sub> (ng/L)	TXB <sub>2</sub> /6-Keto-PGF <sub>1α</sub>
空白对照组	10	10.50 ± 1.32	33.14 ± 4.21	0.32 ± 0.07
模型组	9	25.16 ± 2.93 <sup>a</sup>	25.40 ± 4.03 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.24 <sup>a</sup>
地塞米松组	10	18.94 ± 2.54 <sup>ab</sup>	29.52 ± 3.97	0.65 ± 0.10 <sup>ab</sup>
中药高剂量组	10	12.77 ± 2.31 <sup>bc</sup>	28.43 ± 2.90	0.43 ± 0.11 <sup>b</sup>
中药中剂量组	10	15.04 ± 1.64 <sup>abc</sup>	28.79 ± 1.61	0.53 ± 0.08 <sup>b</sup>
中药低剂量组	10	17.53 ± 1.65 <sup>ab</sup>	30.32 ± 3.20	0.62 ± 0.07 <sup>ab</sup>

注:与空白对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与地塞米松组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

PGF<sub>1α</sub>增高,6-Keto-PGF<sub>1α</sub>降低。与模型组比较,各给药组 TXB<sub>2</sub>浓度均显著降低( $P < 0.01$ ),中药高剂量组最低,中剂量组次之,提示黛黄芍药散可降低放射性直肠炎大鼠血清中 TXB<sub>2</sub>浓度;与地塞米松组比较,中药中剂量及高剂量组 TXB<sub>2</sub>浓度均较低( $P < 0.05$ ),提示黛黄芍药散较地塞米松可有效降低放射性直肠炎大鼠 TXB<sub>2</sub>水平。6-Keto-PGF<sub>1α</sub>浓度比较,各给药组与模型组比较差异不明显( $P > 0.05$ )。TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub>比值比较来看,各给药组均低于模型组( $P < 0.01$ ),以中药高剂量组最为明显,中剂量组次之,提示黛黄芍药散可有效降低放射性直肠炎大鼠血清中 TXB<sub>2</sub>及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub>水平。见表 2。

### 3 讨论

正常条件下,直肠组织中 COX-2 含量较低,以维持机体正常生理活动。在病理过程中,NF-κB、PPAR-γ、TNF-α 等多种炎症因子刺激下,COX-2 表达增加,并将花生四烯酸催化合成前列腺素类物质,如血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)、前列环素(PGI<sub>2</sub>)等,参与机体各种病理生理过程。TXA<sub>2</sub>和 PGI<sub>2</sub>是一对重要的血管活性物质调节因子,在调节肠道微循环中有重要作用。其中 TXA<sub>2</sub>可促进血管收缩、血小板内环腺苷酸的聚集和血栓形成,从而发挥止血作用。PGI<sub>2</sub>具有较强的舒张血管、抗血小板聚集和抑制血栓形成的作用<sup>[6]</sup>。TXA<sub>2</sub>与 PGI<sub>2</sub>很不稳定,在血液中迅速水解为 TXB<sub>2</sub>与 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>,两者相互拮抗<sup>[7]</sup>。在正常条件下,TXB<sub>2</sub>与 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>两者维持一定比例,在受到辐射损伤时,TXB<sub>2</sub>与 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>浓度产生异常变化,两者平衡失调,进而导致循环障碍、出血、血栓形成,引起肠黏膜微循环阻塞,加速炎症反应。

黛黄芍药散为临床经验方,由青黛、黄连、黄柏、牡丹皮、赤芍及血竭粉组成,具有清热解毒、凉血止血、燥湿止泻的功效。本实验表明,黛黄芍药

散可有效减少放射性直肠炎大鼠 COX-2 和 TXA<sub>2</sub>含量,平衡 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub>比值,且在降低 TXB<sub>2</sub>水平方面,黛黄芍药散高剂量较地塞米松效果显著,在降低 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF<sub>1α</sub>比值方面,黛黄芍药散高、中剂量效果与地塞米松相当。因此,推测其作用机制可能是通过抑制 COX-2 的表达,减少 TXA<sub>2</sub>的合成与释放,从而调节 TXB<sub>2</sub>与 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>比值,进而改善肠黏膜微循环,减轻炎症反应。

以往的动物实验主要集中于药物对炎症反应的直接影响,本实验着眼于炎症反应的放大因素——微血管血栓形成及其机制,从而为放射性直肠炎的研究提供新视角。

### 参 考 文 献

- [1] Larsen TB, Nielsen JN, Fredholm L, et al. Platelets and anticoagulant capacity in patients with inflammatory bowel disease [J]. Pathophysiol Haemost Thromb, 2002, 32(2): 92-96.
- [2] 施嫣红,黄培新,郭传勇. 溃疡性结肠炎患者血小板功能的临床研究[J]. 同济大学学报:医学版, 2006, 27(2): 48-50.
- [3] Cao MB, Dong L, Lu XL, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and its pathogenic effects in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Journal of Nanjing Medical University, 2008, 22(2): 111-116.
- [4] 陈岳林,聂亚,方圆,等. 瘦素上调动脉内皮细胞环氧合酶-2 及其产物的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(4): 647-651.
- [5] Cagatay K, Oktar A, Murat A, et al. Histopathological comparison of topical therapy modalities for acute radiation proctitis in an experimental rat model [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(30): 4879-4883.
- [6] 饶梦琳,唐蜜,何锦悦,等. 芍药苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注脑血流量及 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>平衡的影响[J]. 药学报, 2014, (1): 55-60.
- [7] 包怡敏,刘爱华,张志雄,等. 银杏酮酯与丹参预处理对心肌缺血再灌注中环氧合酶-2 及其下游效应物的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(10): 1056-1060.

(收稿日期: 2015-10-22)

(本文编辑: 董历华)