

清肠温中方对三硝基苯磺酸诱导的实验性结肠炎大鼠肠黏膜作用的研究

刘丽娟 王允亮 史瑞 魏仕兵 杨美娟 李军祥

【摘要】 目的 研究清肠温中方对三硝基苯磺酸诱导的实验性结肠炎大鼠结肠黏膜的作用。**方法** 以三硝基苯磺酸灌肠诱导大鼠急性结肠炎,造模成功后连续以清肠温中方高、中、低剂量混悬液及柳氮磺吡啶(salazosulfapyridine, SASP)混悬液灌胃治疗 10 天,取结肠,进行疾病活动指数(disease activity index, DAI),结肠黏膜损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI)和结肠组织病理学(histological score, HS)评价。**结果** 药物干预 10 天后,模型组 DAI、CMDI、HS 明显高于正常组($P < 0.05$);SASP 组 DAI 及 CMDI 均较模型组有明显的下降($P < 0.05$);清肠温中方各剂量组 DAI、CMDI、HS 水平较模型组均明显下降($P < 0.05$),其中清肠温中方高、中剂量组炎细胞浸润的程度明显低于模型组($P < 0.05$)。**结论** 清肠温中方对三硝基苯磺酸诱导的结肠炎大鼠肠黏膜有保护作用,且能有效改善结肠组织炎细胞浸润。

【关键词】 清肠温中方; 疾病活动指数; 结肠黏膜损伤指数; 病理学评价; 炎症浸润

【中图分类号】 R254.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.03.006

Effect of Qingchang Wenzhong Decoction on colonic mucosa of TNBS-induced colitis rats LIU Lijuan, WANG Yun-liang, SHI Rui, et al. Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: LI Jun-xiang, E-mail: lijx970508@sohu.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of Qingchang Wenzhong Decoction (QCWZD) on colonic mucosa on a rat model of experimental inflammatory bowel disease (IBD). **Methods** Colitis was induced in male sprague-dawley (SD) rats by intracolonic administration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), 100 mg/kg. QCWZD preparation and salazosulfapyridine (SASP) was given by gavage route daily for 10 days. Disease activity index (DAI), colonic mucosa damage index (CMDI), histological score (HS) were estimated. **Results** DAI, CMDI, HS was significantly higher in TNBS-treated rats ($P < 0.05$); DAI and CMDI decreased in SASP-treated TNBS-induced colitis rats ($P < 0.05$). QCWZD preparation reduced DAI, CMDI and HS of TNBS-induced rats ($P < 0.05$); QCWZD preparation (1200 mg/kg, 600 mg/kg) reduced inflammatory infiltration (II) of colon ($P < 0.05$). **Conclusions** Data obtained indicated that QCWZD could protect colonic mucosa by reducing inflammatory infiltration.

【Keywords】 Qingchang Wenzhong Decoction; Disease activity index; Colonic mucosa damage index; Histological score; Inflammatory infiltration

基金项目:北京中医药大学创新团队资助项目(2011-CXTD-24)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院脾胃肝胆科[刘丽娟(博士研究生)、王允亮(博士研究生)、史瑞、魏仕兵(硕士研究生)、李军祥];北京中医药大学基础医学院(杨美娟)

作者简介:刘丽娟(1984-),女,2012 级在读博士研究生。研究方向:中医药防治慢性胃肠道疾病。E-mail: liliu609@163.com

通讯作者:李军祥(1964-),博士,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治慢性肝胆和胃肠道疾病。E-mail: lijx970508@sohu.com

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组特发性、慢性、炎症性肠道疾病状态,包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)^[1]。IBD 过去常见于发达国家,近几十年发展中国家的发病率逐步上升^[2]。中医药对 IBD 的治疗有着明显的优势^[3]。清肠温中方在临床 IBD 的治疗中有着显著的疗效,本研究拟在观察清肠温中方对 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-tri-

nitro-Benzenesulfonic acid, TNBS) 诱导的实验性结肠炎大鼠肠黏膜的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康雄性 SD 大鼠, 46 只, 体重 (200 ± 20) g, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号: SCXK(京)2012-0001], 常规饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房, 12 小时光照/黑夜循环, 温度 (22 ± 2) °C, 湿度 50 ~ 60%; 自由饮食饮水饲养。

清肠温中方配方颗粒(黄连 9 g、炮姜 9 g、三七 6 g、木香 6 g、炙甘草 3 g 等)购自北京中医药大学东方医院配方颗粒药房; 柳氮磺吡啶片(SASP, 上海中西三维药业有限公司)购自北京中医药大学东方医院药房; TNBS, 5% (w/v) 购自 sigma(P2297), 冰乙酸(NO. 81601)、邻甲联苯胺(NO. 61805)购自国药集团化学试剂北京有限公司。

1.2 动物分组与造模

SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字表随机分为正常组(5 只)、模型组(10 只)、柳氮磺吡啶组(400 mg/kg, 10 只)、高剂量组(清肠温中方生药量 1200 mg/kg, 10 只)、中剂量组(清肠温中方生药量 600 mg/kg, 10 只)、低剂量组(清肠温中方生药量 300 mg/kg, 10 只)。采用 TNBS/乙醇复合法复制实验性结肠炎大鼠模型^[4]。造模前大鼠禁食不禁水 24 小时, 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉大鼠, 将乳胶软管液体石蜡润滑后由肛门缓慢轻插入直肠约 8 cm, 一次性缓慢推注含 33.3% 乙醇的 TNBS 溶液(100 mg/kg)0.6 ml, 1 分钟之内完成, 保持仰卧位臀部向上 15 分钟, 空白组灌入等量去离子水, 自然苏醒后放回笼中, 常规饲养。造模 3 天后随即取 5 只大鼠处死后观察结肠以确定造模成功。造模第 4 天连续给予相应药物灌胃治疗 10 天, 模型组及正常组以去离子水对照, 10 ml/kg, 每天观察大鼠一般状况, 称取体重, 检测大便潜血, 观察大便一般性状。以造模第一天为 DAY1, 灌胃结束为 DAY13。

1.3 标本采集与处理

末次给药后, 禁食不禁水 24 小时准备结肠, 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g)腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 常温放置 3 小时后离心分离血清(3000 rpm, 10 分钟), 分装后 -20°C 冻存备用; 分离

远端结肠 10 cm, 沿肠系膜纵轴剪开肠腔, 冰 PBS 冲洗后观察结肠黏膜损伤情况; 取结肠损伤明显处 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 放入 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片 $4\text{ }\mu\text{m}$, HE 染色观察病理。

1.4 疾病活动指数、结肠黏膜损伤指数

便潜血采用邻甲联苯胺法检测^[5]: 取 2 ~ 3 滴 0.15 L/L 邻甲联苯胺冰乙酸溶液滴于粪便上, 滴加 3% 过氧化氢 2 ~ 3 滴, 立即观察结果, 在 2 分钟内显蓝色为阳性。疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分^[6]: 体质量: 0 分无下降, 1 分下降 1% ~ 5%, 2 分下降 5% ~ 10%, 3 分下降 10% ~ 15%, 4 分下降 > 15%; 大便性状: 0 分正常, 2 分松散, 4 分腹泻; 大便隐血: 0 分无, 2 分阳性, 4 分肉眼血便。DAI = (体质量下降分数 + 粪便性状分数 + 隐血分数)/3。

结肠黏膜损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI)评分^[7]: 0 分无损伤; 1 分无溃疡; 2 分肠壁变厚, 无溃疡; 3 分有溃疡, 直径 < 1 cm; 4 分有溃疡, 直径 > 1 cm, 肠管与周围组织无粘连; 5 分有溃疡, 直径 > 1 cm, 肠管与周围组织有粘连。CMDI、DAI 评估均由非课题组成员完成。

1.5 结肠组织病理学评分

石蜡切片常规 HE 染色, 封片。结肠组织病理学评分(histological score, HS)评分标准^[8]: HE 染色后光学显微镜下观察评分, 炎症细胞浸润(inflammatory infiltration, II): 0 分无炎细胞浸润, 1 分轻度, 2 分重度; 肉芽肿: 0 分无, 1 分轻, 2 分重; 病变深度: 0 分黏膜层, 1 分黏膜下层, 2 分肌层, 3 分浆膜层, 计算总分, 每个样本随机取 3 个视野, 计算平均分。HS 评估均由非课题组成员在病理老师指导下完成。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量及评分指标用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, DAI、CMDI、HS、II 评分资料不符合正态分布或方差不齐进行非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及 DAI

造模后第 2 天, 模型组大鼠出现腹泻, 为黄色稀便、半稀便甚至血便。大鼠毛色失去光泽, 活动性差, 反应迟缓、懒动, 至第 3 天 DAI 到最大。

第 5 天(总第 7 天, DAY7)各用药组大鼠精神

好转,毛色渐有光泽,食欲增加,活动逐渐增多,大便逐渐正常,DAI 明显下降($P < 0.05$,非参数检验),用药第 5 天(总第 7 天,DAY7)到用药 10 天(总第 13 天,DAY13)DAI 的恢复较为缓慢,无明显差别($P > 0.05$,非参数检验)。空白组大鼠则无上述精神、食欲、活动、毛色等情况,如表 1。药物干预 10 天后,模型组 DAI 仍明显高于正常组($P = 0.003 < 0.05$,非参数检验),SASP 组及清肠温中方各剂量组均较模型组有明显的下降($P < 0.05$,非参数检验),清肠温中方高中低剂量组 DAI 水平较 SASP 组无明显差异($P > 0.05$,非参数检验),如表 2。死亡情况:实验过程中空白组无死亡,模型组死亡 4 只,柳氮磺吡啶组死亡 1 只,清肠温中方高剂量组死亡 3 只,中剂量组死亡 2 只,低剂量组死亡 1 只。

表 1 DAI 日变化表

分组	DAY1	DAY3	DAY7	DAY13
空白组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.15
模型组	0.00 ± 0.00	1.53 ± 0.39	0.90 ± 0.75 ^a	0.95 ± 0.49 ^{ade}
SASP 组	0.00 ± 0.00	1.83 ± 0.39	0.67 ± 0.54 ^a	0.48 ± 0.35 ^{adf}
高剂量组	0.00 ± 0.00	1.37 ± 0.56	0.57 ± 0.32 ^a	0.50 ± 0.25 ^{adfg}
中剂量组	0.00 ± 0.00	2.10 ± 0.47	0.53 ± 0.61 ^a	0.45 ± 0.27 ^{adfg}
低剂量组	0.00 ± 0.00	2.13 ± 0.45	0.47 ± 0.39 ^a	0.46 ± 0.31 ^{adfg}

注:与 DAY3 比较,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$;与 DAY7 比较,^c $P < 0.05$,^d $P > 0.05$;与空白组比较,^e $P < 0.05$;与模型组比较,^f $P < 0.05$;与 SASP 组比较,^g $P > 0.05$

2.2 大鼠结肠 CMDI

模型组肉眼可见结肠黏膜糜烂重,溃疡较深而且面积较大,溃疡处有明显肠内容物嵌入,不易冲洗;可见明显水肿,充血,结肠表面覆盖有红褐色炎症性伪膜;结肠病变处肠腔扩张变形;结肠与周围组织粘连明显,不易分离。各用药组结肠与周围组织粘连较轻,结肠表面未见红褐色炎症性伪膜,充血、水肿减轻,溃疡呈愈合性表现。用药 10 天后,模型组 CMDI 仍明显高于空白组($P = 0.003 < 0.05$,非参数检验),SASP 组及清肠温中方中剂量组较模型组均明显下降($P < 0.05$,非参数检验),此二组 CMDI 水平无明显差异($P = 0.671 > 0.05$),非参数检验),如表 2。

表 2 清肠温中方对 TNBS 诱导的结肠炎大鼠 CMDI 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	CMDI(分)
空白组($n = 5$)	0.20 ± 0.45
模型组($n = 6$)	3.33 ± 0.82 ^a
SASP 组($n = 9$)	2.44 ± 0.73 ^b
高剂量组($n = 7$)	2.50 ± 1.22
中剂量组($n = 8$)	2.25 ± 0.89 ^{bc}
低剂量组($n = 9$)	3.00 ± 0.00

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 SASP 组比较,^c $P > 0.05$

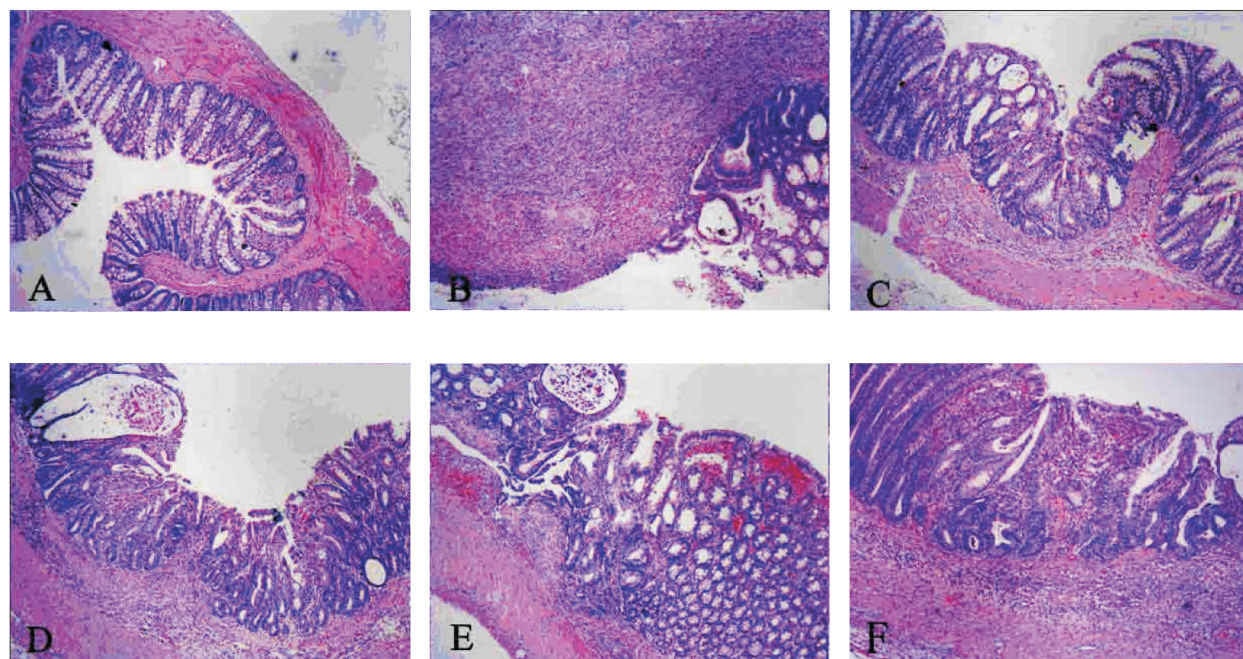
2.3 大鼠结肠病理

模型组光镜下可见黏膜充血、水肿,大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞及中性粒细胞为主,病变深度达黏膜下层、肌层甚至浆膜层;杯状细胞明显减少,溃疡周围的部分腺体扩张,腺体排列紊乱,部分腺上皮细胞轻度增生及非典型增生,可见炎症性肉芽肿。各治疗组光镜下可见充血、水肿减轻,炎细胞浸润减轻,以淋巴细胞、浆细胞为主,中性粒细胞少见,个别结肠组织可见嗜酸性粒细胞,炎细胞浸润层次变浅,集中在黏膜下层,如图 1。模型组结肠组织病理学评分明显高于空白组($P = 0.001 < 0.05$,非参数检验),清肠温中方各个剂量组结肠组织病理学评分均明显低于模型组($P < 0.05$,非参数检验),其中清肠温中方高、中剂量组炎细胞浸润的程度明显低于模型组($P < 0.05$,非参数检验),如表 3。

表 3 清肠温中方对 TNBS 诱导的结肠炎大鼠病理的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	II(分)	HS(分)
空白组($n = 5$)	0.00 ± 0.00	1.11 ± 1.05
模型组($n = 6$)	1.33 ± 0.82	7.33 ± 0.82 ^a
SASP 组($n = 9$)	1.17 ± 1.03	5.92 ± 2.15
高剂量组($n = 7$)	0.33 ± 0.71 ^b	5.00 ± 1.50 ^b
中剂量组($n = 8$)	0.27 ± 0.46 ^b	3.17 ± 1.40 ^b
低剂量组($n = 9$)	0.93 ± 0.96	5.20 ± 2.40 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$



A 空白组 B 模型组 C SASP 组 D 高剂量组 E 中剂量组 F 低剂量组
图 1 清肠温中方高中低剂量治疗 TNBS 诱导的结肠炎大鼠结肠病理图(×40)

3 讨论

IBD 在发展中国家的发病率逐年升高,现代医学对 IBD 的治疗局限于氨基水杨酸(水杨酸偶氮磺胺吡啶等)、皮质固醇类激素,及免疫调节剂、微生物制剂及生物靶向治疗。氨基水杨酸类及激素类药物具有较大临床副作用及逐年出现的难治性 IBD^[9],免疫调节剂、微生物制剂及生物靶向治疗方法等新兴的治疗方法其临床疗效仍有待证据支持^[10],这些都限制了 IBD 的临床治疗。中医药疗效的显著性使得越来越多研究关注 IBD 的中医药治疗。

清肠温中方是北京中医药大学东方医院消化内科李军祥教授经过多年临床总结的临床经验方,溃疡性结肠炎患者的临床以腹泻,黏液脓血便,腹痛,里急后重为主症,李军祥教授认为其病机是脾虚为本,肠道湿热为标,病机关键为寒热错杂,湿热瘀阻,治疗当清肠温中,化瘀止血,制定清肠温中方,治疗临床溃疡性结肠炎取得很好的效果。本方主要由黄连、炮姜、三七等药组成,方中黄连苦寒入血分,具有清肠止血的功效,炮姜既可温脾止泻,又可制黄连等诸药之苦寒,三七化瘀止血,诸药合用能起到清利肠道湿热,温中健脾,平调寒热,化瘀止血的效果。现代研究显示黄连的主要成分黄连素及其总生物碱均具有显著的抗溃疡及抗菌作用^[11],黄连总碱能通过抗氧化自由基、抑制炎细胞活性对动物

结肠炎起到治疗作用^[12]。炮姜水溶物能有效缩短小鼠的出血时间^[13]。基于此本研究组从结肠黏膜保护观察清肠温中方对 IBD 的作用。

本研究中以 TNBS 作用于 SD 大鼠构建类似于人类发病及症状的 IBD 动物模型,以清肠温中方高中低剂量治疗动物模型,观察清肠温中方对实验性结肠炎大鼠肠黏膜的作用。TNBS 造模 3 天后大鼠均出现明显的血便,大便稀溏,形体消瘦,懒动,毛发无光泽等急性结肠炎症的表现^[4],且 DAI 指数明显增高,证明结肠炎动物模型构建成功。10 天后,模型组 CMDI 及 DAI 下降,但较空白组仍有明显的差异,可见 TNBS 诱导的结肠炎大鼠模型有一定的自愈性,但 10 天并不能完全愈合。药物干预后清肠温中方对结肠炎大鼠 CMDI、DAI、HS 均有明显的改善作用,其中以中剂量组效果最为明显($P < 0.05$),清肠温中方高、中剂量组炎细胞浸润的程度明显低于模型组($P < 0.05$),可见清肠温中方对 TNBS 诱导的结肠炎大鼠的结肠黏膜有保护作用,能有效改善结肠炎细胞浸润,明显的改善疾病症状,可以起到一定的治疗作用,但作用机制并不明确,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Charles N. BERNSTEIN, Michael FRIED, J. H. Krabshuis, 等. 2010 年世界胃肠病学组织关于炎症性肠病诊断和治疗的实

- 践指南[J]. 胃肠病学, 2010, 15(9): 548-558.
- [2] 王玉芳, 欧阳钦, 胡仁伟, 等. 炎症性肠病流行病学研究进展[J]. 胃肠病学, 2013, 18(1): 48-51.
- [3] 周春和, 高玉华, 高社光, 等. 中医辨证论治慢性溃疡性结肠炎临床研究进展[J]. 环球中医药, 2012, 5(9): 717-720.
- [4] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96(3): 795-803.
- [5] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 143.
- [6] Sasaki S, Hirata I, Maemura K, et al. Prostaglandin E2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines[J]. Scand J Immunol, 2000, 51(1): 23-28.
- [7] 吕飞, 卢光新, 杜勇. 复方甘草酸苷对实验性溃疡性结肠炎大鼠白细胞介素 4、白细胞介素 17 水平的影响[J]. 临床荟萃, 2013, 28(2): 178-180.
- [8] Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114(3): 385-391.
- [9] 叶任高, 陆再英, 谢毅, 等. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 411-512.
- [10] Blonski W, Buchner AM, Lichtenstein GR. Treatment of ulcerative colitis[1]. Curr Opin Gastroenterol 2014, 30: 84-96.
- [11] 李彩虹, 周克元. 黄连活性成分的作用及机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 466-468.
- [12] 舒德忠, 万先惠, 刘华蓉, 等. 黄连总碱对实验性溃疡性结肠炎的作用研究[J]. 儿科科学杂志, 2005, 11(3): 7-9, 12.
- [13] 吴建华, 马耀茹. 姜不同炮制品止血作用实验研究[J]. 陕西中医, 2002, 23(5): 449-450.
- (收稿日期: 2013-12-03)
(本文编辑: 黄凡)

地乌三萜皂苷 W_1 对破骨细胞分化和骨吸收功能的影响

杨悦 孔祥英 万红叶 苏晓慧 林娜

【摘要】 目的 探讨地乌三萜皂苷类成分 W_1 对体外破骨细胞分化及骨吸收功能的影响。**方法** 3 个不同浓度(0.0625, 0.125, 0.25 $\mu\text{g/ml}$)的 W_1 与核因子- κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL)诱导的小鼠单核/巨噬细胞 RAW 264.7 共孵育 7 天, 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色观察 TRAP 阳性多核细胞的形成, 甲苯胺蓝染色及扫描电镜观察骨吸收陷窝的形成, 图像分析计算骨吸收陷窝面积百分比; 同 3 个浓度的 W_1 与 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞共孵育 24 小时后收集细胞上清液, 放射免疫法检测肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量; 甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测 W_1 对 RAW264.7 细胞毒性影响。**结果** RANKL 组诱导 RAW 264.7 细胞形成多量 TRAP 阳性多核细胞, 形成明显的骨吸收陷窝, 并诱导 TNF- α 在 RAW264.7 细胞上清中异常高表达; 与 RANKL 组相比, 3 个浓度的 W_1 均能显著减少 TRAP 阳性细胞数($P < 0.01$), 显著减少骨吸收陷窝面积($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$), 明显降低 TNF- α 的表达量($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 且未观察到对 RAW264.7 的细胞毒性。**结论** W_1 对由 RANKL 诱导的体外破骨细胞分化和骨吸收功能有一定的负调节作用。

【关键词】 地乌三萜皂苷 W_1 ; 小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7; 肿瘤坏死因子 α ; 骨吸收

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.03.007

基金项目: 国家科技重大专项(2011ZX09101-006-03); 北京市自然科学基金(7112096); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题(ZZ070836)

作者单位: 100700 北京, 中国中医科学院中药研究所中药理论与本草文献研究中心

作者简介: 杨悦(1989-), 女, 2011 级硕士研究生。研究方向: 中药药理研究。E-mail: yangyue8675658@163.com

通讯作者: 林娜(1963-), 女, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向: 中药药性理论与中药药理。E-mail: linna888@163.com