

肠愈灌肠方治疗溃疡性结肠炎大鼠实验研究

李明¹, 姚玲²

(1. 安徽中医药大学第一附属医院肛肠科, 安徽 合肥 230031;

2. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 观察肠愈灌肠方治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的疗效,并探讨其作用机制。

方法 将64只SPF大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、美沙拉嗪组、肠愈灌肠方组。使用2,4,6-三硝基苯磺酸结肠灌注法复制UC大鼠模型,在实验第12天观察各组大鼠的疾病活动指数(disease activity index, DAI);实验结束后采用ELISA法检测大鼠结肠黏膜组织转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)的含量。**结果** 与模型组比较,肠愈灌肠组、美沙拉嗪组大鼠DAI评分明显降低($P < 0.05$),血清TGF- β_1 显著上升($P < 0.05$),TNF- α 显著下降($P < 0.05$)。

结论 肠愈灌肠方治疗UC的疗效确切,其作用机制可能与降低血清促炎因子,促进抑炎因子表达有关。

[关键词] 肠愈灌肠方; 溃疡性结肠炎; 转化生长因子; 肿瘤坏死因子

[中图分类号] R574.62 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2017.06.019

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病变累及大肠黏膜及黏膜下层的慢性非特异性结肠炎症,临床常以腹痛、腹泻、黏液脓血便为主要表现。

UC可归属于中医学“久痢”“血痢”等范畴,其原因有饮食不当、外感淫邪、内伤情志。《诸病源候论》云:“凡痢皆由荣卫不足,肠胃虚弱,冷热之气乘虚入客于肠间,虚则泄,故为痢也。”西医治疗UC多采用皮质类固醇、磺胺药,可短期控制症状,但易于复发而难以彻底治愈^[1]。安徽中医药大学第一附属医院

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2016A396)

作者简介: 李明(1978-),男,硕士,副主任医师

Neuroprotective Effect of Modified *Dioscorea opposita* Thunb. Pill on Rats with Chronic Cerebral Hypoperfusion by Inhibiting the Activity of Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase

CHEN Yan¹, TAN Zi-hu², LIU Qian¹, ZHU Yuan-yue¹, LIU Yu², YANG Qiong¹

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430060, China; 2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430060, China)

[Abstract] Objective To investigate the change in adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in the hippocampal tissue of rats with chronic cerebral hypoperfusion and the effect of modified *Dioscorea opposita* Thunb. Pill on hippocampal nerve cell damage and related mechanisms of action.

Methods Modified bilateral common carotid artery occlusion was performed to establish a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. Nissl staining was used to observe nerve cell damage, and Western blot was used to measure the expression of AMPK and phosphorylated AMPK (p-AMPK) in the hippocampus.

Results Compared with the normal group, the model group had a significantly lighter color of Nissl staining, a significant reduction in the number of pyramidal cells, and a significant increase in the expression of p-AMPK in the hippocampal CA1 region ($P < 0.05$). Compared with the model group, the traditional Chinese medicine group and the Western medicine group had a significantly darker color of Nissl staining, a significant increase in the number of pyramidal cells, and a significant reduction in the expression of p-AMPK in the hippocampal CA1 region ($P < 0.05$). There were no significant differences in the expression of AMPK and p-AMPK in the hippocampal CA1 region between the traditional Chinese medicine group and the Western medicine group ($P > 0.05$). **Conclusion** Excessive activation of AMPK after chronic cerebral hypoperfusion in rats causes hippocampal nerve cell damage, and modified *Dioscorea opposita* Thunb. Pill can inhibit the activation of AMPK and alleviate nerve injury in the hippocampus.

[Key words] Chronic cerebral hypoperfusion; Adenosine monophosphate-activated protein kinase; Modified *Dioscorea opposita* Thunb. Pill; Hippocampus; Bilateral common carotid artery occlusion

肛肠科广泛运用肠愈灌肠方保留灌肠治疗 UC 多年,疗效确切,本方由白及、黄柏、苦参、仙鹤草及锡类散按一定比例组成。本研究拟从炎性因子角度探讨肠愈灌肠方治疗 UC 的疗效及其作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 SPF级大鼠64只,雌雄各半,体质量(179±10)g,由安徽中医药大学实验中心提供,生产许可证号为SCXK(皖)2011-002,饲养于安徽中医药大学实验动物房,温度(20±4)℃,湿度45%~60%,通风良好,光照随昼夜浮动,饲养环境符合本实验要求。

1.2 主要试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS);Sigma公司,批号SLBG2566V;大便隐血检测试剂盒:艾康生物技术(杭州)有限公司,批号S20043037;美沙拉嗪:上海爱的发制药有限公司,批号114797,每支500mg;转化生长因子 β_1 (transforming growth factor-beta 1, TGF- β_1)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)试剂盒:北京百诺威生物科技有限公司,批号分别为20120508、20120426;水合氯醛:天津市福晨化学试剂厂,批号20130412;甲醛溶液:国药集团化学试剂北京有限公司,批号204519。

1.3 主要仪器与设备 Multiskan MK2 酶标仪:北京北实纵横科技发展有限公司;HH.B11.600 电热恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂;台式高速冷冻离心机:无锡市瑞江分析仪器有限公司;光镜(CKX41):日本奥林巴斯公司;透射电子显微镜(JEM1230):日本电子株式会社;化学发光成像系统(Chemidoc XRS):美国Bio-Rad公司。

1.4 受试药物及制备

1.4.1 肠愈灌肠方组成 白及、黄柏、苦参、仙鹤草免煎颗粒剂均为广东一方制药有限公司生产,各10g;锡类散:江苏707天然制药厂生产,1.0g。肠愈灌肠方制备:用40~50℃的热蒸馏水50mL溶解黄柏、白及、苦参、仙鹤草的颗粒剂,再加入锡类散1g,调配完成后冷却至30℃左右备用,浓度为0.082mg/L。

1.4.2 美沙拉嗪悬液制备:在研钵中用力将其磨成均匀的混悬液,加入适量热蒸馏水,使浓度为0.082mg/L(等同于肠愈灌肠方浓度),调配完成后冷却至30℃左右备用。

2 方法

2.1 动物分组 将64只大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、美沙拉嗪组、肠愈灌肠方组,正常对照组及模型组每组17只,其余每组15只。

2.2 模型复制 依据MORRIS等^[2]方法采用TNBS复制UC大鼠模型。大鼠适应性饲养1周后,正

常对照组全程常规饲养,其余各组禁食不禁水24h后,给予10%水合氯醛3L/kg腹腔麻醉,待大鼠瘫痪后,先分别称质量,记录每只大鼠质量后,用1mL注射器按照0.02mL/kg的5%TNBS+50%乙醇0.25mL比例抽吸试剂,拔去针头,连接小儿灌肠管(经液体石蜡浸润)插入肛门上段8cm,一次性注入复制模型的试剂,再吸取0.3mL空气,注入肛门,轻揉大鼠腹部1min,使TNBS-乙醇液均匀地与大鼠结肠黏膜接触。然后将大鼠头向下,身体倾斜45°,放置15min,再将大鼠放平。用同样方法将正常对照组大鼠麻醉,给予同容积生理盐水灌肠。

2.3 模型鉴定及给药 模型复制结束后,若大鼠出现腹泻、大便次数多,黏液脓血便、进食减少、消瘦拱背、毛发无光泽等现象,并随机选取模型组和正常对照组大鼠各2只,颈椎脱臼处死后,截取病变结肠1~2cm进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,进行病理检查,对比观察正常对照组及模型组,若模型组大鼠出现结肠充血、水肿、炎性细胞浸润、溃疡等变化,则为模型复制成功。

确定模型复制成功后,正常对照组及模型组全程给予充足饲料及蒸馏水喂养;美沙拉嗪组大鼠用美沙拉嗪悬液3mL灌肠,灌肠之前采用常规水合氯醛麻醉,用5mL注射器抽吸3mL美沙拉嗪悬液,然后去掉针头,套上小儿灌肠管,均匀涂抹润滑油,力度适中,插入大鼠肛门3~5cm,注入药物,然后将大鼠头向下,身体倾斜45°,放置15min,再将大鼠放平;肠愈灌肠方组大鼠给予同容积药物灌肠,正常对照组及模型组予以同容积蒸馏水灌胃。

2.4 取材 末次给药24h后,用水合氯醛麻醉,颈椎脱臼处死后,立即剖腹,分离结肠,自肛门2cm处向上取结肠6~8cm,沿肠系膜纵轴剪开肠腔,用4℃生理盐水冲洗干净,留取各组结肠1段,4%多聚甲醛固定。

2.5 指标检测

2.5.1 实验大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分标准^[3] 立即称量各组大鼠体质量,记录每组大鼠的大便性状,运用大便隐血检测试纸对每组大鼠的粪便进行隐血检测。DAI为大鼠体质量下降评分、大便隐血评分和大便性状评分的均数。在实验进程的第12天对各组大鼠进行DAI评分。评分标准如下:0分:大便性状正常,质量下降0%,隐血实验(-);1分:软便,体质量下降1%~5%,隐血实验(-);2分:软便,体质量下降6%~10%,隐血,实验(-);3分:腹泻,体质量下降11%~15%,隐血实验(+);4分:腹泻,体质量下降

15%以上,肉眼血便。

2.5.2 ELISA法检测大鼠结肠黏膜组织 TGF- β_1 、TNF- α 的含量 将结肠黏膜组织匀浆,取上清液,标准品稀释,加样于酶标板底,封板温育 30 min,稀释洗涤液洗涤,加酶标试剂,洗涤,显色,终止,450 nm 波长测定吸光值,检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,实验数据以“均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)”表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 DAI 评分比较 肠愈灌肠方组及美沙拉嗪组 DAI 评分与模型组比较,均明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 模型复制后第 12 天各组大鼠 DAI 评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	DAI 评分
正常对照	15	0
模型	15	4.87 \pm 0.87
美沙拉嗪	15	0.91 \pm 0.98 [#]
肠愈灌肠方	15	1.21 \pm 0.37 [#]

注:与模型组比较,[#] $P<0.05$

3.2 各组大鼠结肠黏膜组织 TGF- β_1 、TNF- α 水平比较 与正常对照组比较,模型组大鼠结肠黏膜组织中 TGF- β_1 水平明显降低,TNF- α 水平明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,肠愈灌肠方组 TGF- β_1 水平明显升高,TNF- α 水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);肠愈灌肠方组 TNF- α 含量与美沙拉嗪组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠结肠黏膜组织中 TGF- β_1 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF- β_1 /(μ g/L)	TNF- α /(μ g/L)
正常对照	15	329.38 \pm 38.85	259.93 \pm 29.33
模型	15	251.97 \pm 43.00*	647.85 \pm 34.04*
美沙拉嗪	15	274.63 \pm 27.93	347.08 \pm 46.53 [#]
肠愈灌肠方	15	291.11 \pm 38.62 [#]	384.62 \pm 41.30 [#] Δ

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与美沙拉嗪组比较, Δ $P<0.05$

4 讨论

UC 是一种慢性肠道疾病,其发病机制不明。临床上多采用氨基水杨酸类、激素和免疫抑制剂等治疗,但疗效有限,且容易复发^[4]。中医认为 UC 多因脾胃虚弱复感外邪、饮食不洁、情志不畅,导致肠腑气机失调,继而导致腹泻。失治误治,反复发作,久泻不愈,必伤及肾,引起脾肾阳虚,加重腹泻^[5]。该病以脾气亏虚为本,气滞、血瘀、湿热阻滞为标。

中医对于 UC 的维持治疗有一定的优势,并且不良反应小,方法简单,容易接受。

肠愈灌肠方是安徽中医药大学第一附属医院肛肠科多年应用于 UC 的经验方,含有黄柏、白及、苦参、仙鹤草、锡类散等成分。黄柏味苦、性寒,归肾、膀胱经,能清热燥湿、泻火解毒、消肿祛腐。白及性苦、甘、涩,微寒,入肺经,功效收敛止血、消肿生肌,促进细胞生长,可用于治疗溃疡肿痛及手足皲裂等症。研究表明,白及除具有止血作用外,还有增加伤口巨噬细胞数量,提高创面愈合速度和愈合质量的作用^[6]。苦参具有清热燥湿、杀虫、利尿等功效。仙鹤草苦、涩、平,入心、肝经,功效收敛止血、截疟止痢、解毒补虚。锡类散由青黛、珍珠、冰片等组成。锡类散灌肠治疗 UC 的效果确切,可有效改善患者胃肠道功能,促进 UC 患者恢复^[7]。现代研究提示,锡类散可以改善机体免疫应答,缓解炎症损伤,从而治疗 UC^[8]。诸药共奏清热利湿、护膜生肌之效。中药保留灌肠可保护肠道溃疡面,改善局部血液运行,促进炎症吸收和溃疡愈合。

TGF- β 最早由 ROBERTS 等^[9]从小鼠的肉瘤细胞中分离得到,是由二硫键相连形成的一种同源二聚体多肽分子,分子量 25 kDa。TGF- β_1 是其重要家族成员^[9]。TGF- β_1 在肠道黏膜中高度表达,并与免疫细胞的分化、增殖、激活、创伤修复、血管生成有关,而且与免疫异常有关,如炎症性肠病^[10]。TGF- β_1 /Smads 信号通路的失调是 UC 发生的重要机制,TGF- β_1 可调节 UC 患者的免疫反应,是 UC 的重要抑炎因子。CIECKO-MICHALSKA 等推荐 TGF- β_1 用来评估 UC 的活动度^[11]。本研究发现,肠愈灌肠组及美沙拉嗪组 TGF- β_1 水平较模型组明显升高,说明肠愈灌肠方可能通过刺激 TGF- β_1 的产生抑制炎症反应。

TNF- α 是与 UC 发病关系最密切的促炎因子之一,由单核-巨噬细胞以及 T 细胞产生并释放^[12]。TNF- α 可作为 UC 炎性分级的相关指标,且与内镜分级相关^[13]。本研究表明,模型组 TNF- α 水平较正常组明显升高,说明 UC 可能是通过诱发 TNF- α 升高而导致炎症反应。本研究中,肠愈灌肠方组 TNF- α 水平较模型组明显降低,说明肠愈灌肠方可能通过调节 TNF- α 的表达,继而控制炎症反应。

综上所述,本研究利用 TNBS 复制 UC 大鼠模型,分别采用肠愈灌肠方和美沙拉嗪干预治疗,并对比治疗结果,观察肠愈灌肠方治疗 UC 的临床疗效。实验结果表明,肠愈灌肠方治疗 UC 的效果明显,与前期研究结果^[14-17]一致。近年来,UC 的治疗目标

越来越侧重于黏膜愈合,而中国 UC 患者多于左半结肠发病,肠愈灌肠方采用的保留灌肠方式对于治疗左半结肠的溃疡性病变具有明显优势。但 UC 的致病机制复杂,目前多认为其发病机制与免疫失调有关,是由促炎因子及抑炎因子失调所致,今后可从信号通路及炎症因子网络途径进一步研究肠愈灌肠方的作用机制。

参考文献:

- [1] 李斌,孙宁.乌梅丸及其拆方对溃疡性结肠炎大鼠炎症因子及 TLR9/MyD88/NF- κ Bp65 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31(5):1901.
- [2] MORRIS G P, BECK P L, HERRIDGE M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(2):795-803.
- [3] 谢艳,魏兵,欧阳钦.疾病活动指数在炎症肠病诊治中的应用[J]. 中国消化杂志,2001,21(9):559-560.
- [4] 王碧玉,刘富林.痛泻要方对溃疡性结肠炎模型大鼠血清 IL-12 含量及 NPY 水平影响的研究[J]. 湖南中医杂志,2016,34(4):167.
- [5] 张卫,梁世娇.隔药灸对 UC 大鼠血清 Th17、相关细胞因子的影响[J]. 光明中医,2016,31(8):1093.
- [6] 孙仁山,陈晓,程天民.白及对大鼠创面愈合要素的影响[J]. 中国临床康复,2003,7(29):3927-3929.
- [7] 于亚杰.八味锡类散灌肠治疗溃疡性结肠炎作用机制研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(24):55.
- [8] 杨豫伟.八味锡类散灌肠对溃疡性结肠炎的治疗观察[J]. 世界最新医学信息文摘,2016,16(29):143.
- [9] ROBERTS A B, LAMB L C, NEWTON D L, et al. Transforming growth factors: isolation of polypeptides

from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(6):3 494-3498.

- [10] BURCHILL M, YANG J, VANG K, et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire[J]. *Immunity*, 2008, 28(1): 112-121.
- [11] CIECKO-MICHALSKA, WIERZBICKA-TUTKA. TGF- β_1 and granulocyte elastase in the evaluation of activity of inflammatory bowel disease: a pilot study[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2014, 68(23):66-72.
- [12] 王艳萍,姬林松.不同严重程度溃疡性结肠炎患者血清 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 的表达及意义[J]. 中国老年学杂志,2015,35(7):3940.
- [13] OLSEN T, GOLL R, CUI G. Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis[J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2007, 42(11):1312-1320.
- [14] 李明,王建民,石健.肠炎清 I 号合锡类散保留灌肠治疗湿热内蕴型溃疡性结肠炎 15 例[J]. 安徽中医学院学报,2012,31(3):34-36.
- [15] 李明,王建民,石健.溃疡性结肠炎中医药治疗研究进展[J]. 中医药临床杂志,2010,22(7):647-649.
- [16] 王建民,李明,查德华,等.益气健脾通便方治疗慢传输型便秘疗效观察[J]. 中医药临床杂志,2014,26(10):1026-1027.
- [17] 唐冉,唐昆,李明,等.肠炎 I 号保留灌肠治疗湿热内蕴型溃疡性结肠炎临床研究[J]. 中医药临床杂志,2015, 27(4):521-523.

(收稿日期:2017-03-19;编辑:姚实林)

Effect of Changyu Enema Prescription in Treatment of Rats with Ulcerative Colitis: an Experimental Study

LI Ming¹, YAO Ling²

(1. Department of Coloproctology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China; 2. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of Changyu Enema Prescription in the treatment of ulcerative colitis (UC) and related mechanism of action. **Methods** A total of 64 specific pathogen-free rats were randomly divided into normal control group, model group, mesalazine group, and Changyu Enema Prescription group, using a random number table. Colon perfusion with 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid was performed to establish a rat model of UC, and disease activity index (DAI) was observed on day 12 of the experiment. After the experiment ended, ELISA was used to measure the levels of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the colonic mucosa. **Results** Compared with the model group, the Changyu Enema Prescription group and the mesalazine group had a significant reduction in DAI, a significant increase in serum TGF- β_1 , and a significant reduction in TNF- α (all $P < 0.05$). **Conclusion** Changyu Enema Prescription has a marked effect in the treatment of UC, possibly by reducing the serum levels of proinflammatory factors and promoting the expression of anti-inflammatory cytokines.

[Key words] Changyu Enema Prescription; Ulcerative colitis; Transforming growth factor; Tumor necrosis factor