

实验研究

中药安肠愈疡汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 IL-6、IL-13 含量及 NF- κ B 表达的影响迟莉丽¹ 宋钦兰¹ 程 艳¹ 孙大娟¹ 闫 华¹ 梁峻尉¹ 王 帅¹ 袁 浩²

(1 山东中医药大学附属医院, 济南, 250011; 2 山东中医药大学, 济南, 250355)

摘要 目的:观察中药复方安肠愈疡汤对溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)大鼠结肠组织中 IL-6、IL-13 含量及 NF- κ B 表达的影响,以探讨其作用机制。方法:将 90 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组(空白对照组,模型对照组,安肠愈疡汤低、中、高剂量组和美沙拉嗪组)。除空白组外,其他各组均应用三硝基苯磺酸(TNBS)制备 UC 大鼠模型,造模成功后,按照组别分别给予不同剂量的实验药物,连续给药 3 周后,进行结肠组织肉眼形态评分,同时采用 ELISA 法检测结肠组织中 IL-6、IL-13 含量,免疫组化法检测 NF- κ B 蛋白表达。结果:安肠愈疡汤中、高剂量组及美沙拉嗪组大鼠结肠黏膜均有不同程度的炎症修复、溃疡愈合($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中高剂量组及美沙拉嗪组明显优于中、低剂量组,但 2 组比较无统计学意义($P > 0.05$);在 IL-6 方面,安肠愈疡汤低、中、高剂量组及美沙拉嗪组的含量均不同程度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中,高剂量组及美沙拉嗪组明显优于中、低剂量组($P < 0.01$),但 2 组之间无统计学意义($P > 0.05$);在 IL-13 方面,安肠愈疡汤中、高剂量组及美沙拉嗪组的含量均不同程度升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),尤以高剂量组效果最好,与美沙拉嗪组比较有差异有统计学意义($P < 0.05$);在 NF- κ B 表达方面,安肠愈疡汤中、高剂量组及美沙拉嗪组均有不同程度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中高剂量组效果最好,但与美沙拉嗪组相比无统计学意义($P > 0.05$)。结论:安肠愈疡汤具有较好的抗炎和促进溃疡修复的作用,可能是通过下调致炎因子 IL-6,上调抗炎因子 IL-13,同时降低 NF- κ B 表达,从而起到治疗 UC 的作用。

关键词 溃疡性结肠炎;中药安肠愈疡汤;IL-6;IL-13;NF- κ B;实验研究

Effect of Anchang Jieyu Decoction on the Expression of IL-6, IL-13 and NF- κ B in Ulcerative Colitis MiceChi Lili¹, Song Qinlan¹, Cheng Yan¹, Sun Dajuan¹, Yan Hua¹, Liang Junwei¹, Wang Shuai¹, Yuan Hao²

(1 Affiliated Hospital to Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250011, China;

2 Shangdong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism of Anchang Jieyu decoction by detecting its effect on the expression of IL-6, IL-13 and NF- κ B in rats with ulcerative colitis (UC). **Methods:** Ninety Wistar rats were randomly divided into six groups (blank control group, model control group, Anchang Jieyu decoction low, medium, high dose group and Sulfasalazine (5-ASA) group). Except for the blank group, the other groups were given trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) to produce rat model of UC. Different groups were given different dose of drugs respectively. After 3 weeks' administration, colon tissue of the eye morphology scores, IL-6, IL-13 content, and NF- κ B protein expression were detected. **Results:** Rats in Anchang Jieyu decoction low, medium, high dose group and 5-ASA group showed varying degrees of improvement and ulcer healing ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), of which the high dose group and the 5-ASA were superior to others, but comparison between the two groups showed no statistical significance ($P > 0.05$); In level of IL-6, TCM low, medium and high dose group and the 5-ASA group were differently lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Among them, the high dose group and the 5-ASA were superior to middle and low dose group ($P < 0.01$), but no statistical significance had showed between the two groups ($P > 0.05$); In level of IL-13, TCM high dose group and 5-ASA group were differently increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), especially in high dose group. Besides, compared with 5-ASA group, there was significant differences ($P < 0.05$); In level of NF- κ B, TCM medium, high dose group and 5-ASA group have declined ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), in which the effect of high dose group performed the best. While compared with 5-ASA group, there were no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** Anchang Jieyu decoction performs better in anti-inflammation and ulcer repair promo-

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2012HL11)——“溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 NF- κ B、TLR4 表达与其损伤关系及中药复方干预的研究”

通信作者:迟莉丽(1962.9—),女,博士,主任医师,教授,博士生导师,山东中医药大学附属医院脾胃病科主任,研究方向:中西医结合治疗消化系统疾病研究工作,E-mail:chilili@163.com

tion. This may through down regulating pro-inflammatory cytokines IL-6, up regulating anti-inflammatory cytokines IL-13, and inhibiting the expression of NF- κ B, which contribute a lot to the treatment of UC.

Key Words Ulcerative colitis; Anchang Jieyu decoction; IL-6; IL-13; NF- κ B; Experiment

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.030

UC 的病因及发病机制尚未完全阐明,但免疫反应异常被认为在 UC 的发病中扮演重要角色。该病目前尚缺乏满意的治疗方法,已被 WHO 列为现代难治病之一^[1-4],寻求中医药治疗 UC 已成为目前研究热点。课题组通过前期临床和实验研究发现^[5-7],中药安肠愈疡汤能够使结肠组织中 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 含量降低,而升高 IL-10 的含量。本研究进一步观察其对 UC 大鼠结肠组织中 IL-6、IL-13 含量及对 NF- κ B 表达的影响,以期从分子生物学水平探讨安肠愈疡汤治疗 UC 的深层机制。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF 级 Wistar 大鼠 90 只,鼠龄 10~11 周,雌雄各半,体重(200 $\pm$ 10)g。由山东鲁抗医药股份有限公司提供,实验动物合格证 SCXK(鲁)2013-0001。

1.2 受试药物 安肠愈疡汤(生黄芪、薏苡仁、炒白术、黄连、黄芩、败酱草、白及、地榆炭、木香、槟榔、当归、白芍、防风、生甘草),由山东中医药大学附属医院中药制剂室提供,含生药量为 3 g/mL;美沙拉嗪缓释颗粒,生产企业 Ethypharm,法国,批号:14379。

1.3 试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)水溶液:购于上海源叶生物科技有限公司,批号:080M5000,产自 Sigma 公司;进口分装大鼠 IL-6、IL-13 定量试剂盒、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒:SA1022(内含 5% BSA 封闭液,山羊抗兔 IgG,链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒:AR1022 均购自济南博诺生物科技有限公司;

1.4 仪器 可调高速匀浆器 FSH-2 型,金坛市恒丰仪器厂;酶标仪:ELX808, Bio Tek 美国伯腾仪器有限公司;高速低温离心机 MICROMAX RF, Thermo IEC (美国)。

2 方法

2.1 实验分组与造模 适应性饲养大鼠 1 周后随机分为 6 组:空白对照组、模型对照组、安肠愈疡汤低、中、高剂量组、美沙拉嗪组,(以下简称空白组、模型组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组、5-ASA 组)每组 15 只,除空白组外,其余 5 组大鼠均采用 TNBS 法造模^[8],将大鼠禁食(不禁水)24 h 后,

用 10% 水合氯醛行腹腔麻醉,用直径 2.0 mm,长 12 cm 的硅胶管插入肛门约 8 cm,以 100 mg/kg TNBS 加 50% 乙醇 0.25 mL 混合试剂快速注入肛门后,提尾倒立 1 min,待自然苏醒后常规饲养。

2.2 给药剂量及途径 造模后第 3 天开始药物灌胃:中药低、中、高剂量组分别给予含生药为 0.75 g/mL、1.5 g/mL、3 g/mL 的中药灌胃,5-ASA 组用 0.035 g/mL 的美沙拉嗪混悬液灌胃,空白组、正常组:均以蒸馏水灌胃。以上各组均每次 2 mL,2 次/d,连续 3 周。(实验过程中模型组、中药小剂量组、5-ASA 组各死亡 1 只大鼠)

2.3 标本采集及结肠组织形态评分 给药 3 周后,处死大鼠,分离结肠,取出距肛门以上约 8 cm 结肠段,沿肠系膜纵轴剪开,冰生理盐水冲洗,肉眼观察各组大鼠结肠组织,参照 Luketal 标准^[9]进行大体形态评分,再留取各组病变组织置 -80℃ 冰箱速冻保存,以备检测。

2.4 ELISA 法检测 IL-6、IL-13 含量 向预先包被 IL-6、IL-13 抗体的微孔中,依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤,用底色 TNB 显色,TNB 在过氧化物酶的催化下转化为蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD)值,计算样品浓度。

2.5 免疫组化法检测结肠组织 NF- κ B p65 的表达

从实验各组中每组随机抽取 6 个标本进行统一检测,方法:采用经典的 SABC 法,具体步骤严格按照试剂说明书进行操作,以 PBS 代替一抗为阴性对照,采用 Image pro plus4.0 软件进行图像分析。染色强度分为 0-3 级,0 = 阴性染色;1 = 弱阳性染色;2 = 中度阳性染色;3 = 强阳性染色。每个样本所见阳性细胞范围分为 0-4 级,0 = 阴性;1 = 阳性细胞占 1%~25%;2 = 阳性细胞占 26%~50%;3 = 阳性细胞占 51%~75%;4 = 阳性细胞占 76%~100%。每张切片评分以上述两者之积表示。

2.6 统计学方法 实验数据结果采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,差异比较用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验法, $P < 0.05$ 提示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 提示差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 结肠粘膜损伤情况 结果显示,模型组评分明显高于空白组,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),说明造模成功。中药中、高剂量组及 5-ASA 组评分均不同程度降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中,高剂量组及 5-ASA 组明显优于中剂量组,但 2 组之间比较无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 大鼠结肠组织形态学评分比较

组别	N	大体形态评分
空白组	15	0.05 ± 0.21
模型组	14	3.13 ± 1.02 [▲]
中药低剂量组	14	2.69 ± 1.08 [△]
中药中剂量组	15	1.64 ± 0.21 [#]
中药高剂量组	15	1.04 ± 0.28 ^{##}
5-ASA	14	1.06 ± 0.31 ^{##}

注:与模型组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,[△] $P > 0.05$;与正常组比较[▲] $P < 0.01$ 。

3.2 结肠组织中 IL-6、IL-13 含量测定结果 结果显示,中药低、中、高剂量组及 5-ASA 组 IL-6 的含量均不同程度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中,中药高剂量组及 5-ASA 组明显优于中药中、低剂量组($P < 0.01$),但 2 组之间无统计学意义($P > 0.05$);中药中、高剂量组及 5-ASA 组 IL-13 的含量均不同程度升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),尤以中药高剂量组最好,与 5-ASA 组比较有明显统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠结肠组织中 IL-6、IL-13 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	IL-6 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
空白组	15	64.71 ± 11.70	84.22 ± 7.29
模型组	14	98.62 ± 10.11 [▲]	33.42 ± 5.19 [▲]
中药低剂量组	14	83.11 ± 6.78 [#]	46.43 ± 3.19
中药中剂量组	15	76.39 ± 12.71 ^{##}	64.74 ± 5.62 ^{##}
中药高剂量组	15	69.43 ± 11.47 ^{##}	79.84 ± 5.31 ^{##△}
5-ASA	14	68.62 ± 7.29 ^{##}	63.91 ± 4.91 ^{##}

注:与模型组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与正常组比较[▲] $P < 0.01$;与 5-ASA 比较[△] $P < 0.05$ 。

表 3 大鼠结肠组织 NF-κB 检测结果(n=6)

组别	NF-κB (P65)
空白组	2.17 ± 0.52
模型组	5.33 ± 1.12 [▲]
中药低剂量组	4.79 ± 1.18
中药中剂量组	3.12 ± 0.61 [#]
中药高剂量组	2.66 ± 0.59 ^{##△}
5-ASA	3.24 ± 0.70 [#]

注:与模型组比较^{##} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$,与正常组比较[▲] $P < 0.01$,与 5-ASA 比较[△] $P < 0.05$ 。

3.3 结肠组织中 NF-κB、p65 的检测结果 结果显示,中药中、高剂量组及 5-ASA 组 NF-κB 阳性表达率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中以中药高剂量组效果最好($P < 0.01$),但与 5-ASA 组比较无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 3。

4 讨论

UC 可归属中医学“休息痢”“久痢”之范畴。基于本病的证候学演变规律,我们认为本病始终存在着脾失健运、湿热蕴肠、气血淤滞、内疡形成的病理机制,并根据“虚毒瘀”理论,确立了健脾益气、清解化湿、调气和血之治疗大法。方中黄芪、白术,二药合用,补虚安中,健脾益气;薏苡仁健脾渗湿,清热排毒止泻,三药共用为君药;黄连、黄芩清热燥湿止痢,地榆凉血止血三药共为臣药。木香、槟榔行气导滞,破结消积。白芍缓急止痛;当归养血活血,与木香、槟榔相伍有“调气则后重自除,行血则便脓自愈”之意。败酱草清热解毒,消痈排脓,白及收敛止血,消肿生肌。配少量防风取其升散肠风之性。甘草清热解毒、缓急止痛,兼司佐使之职,整方标本兼治,切合病机。

研究表明 IL-6 作为促炎因子,在 UC 的发病中起至关重要的作用^[10-11]。IL-13 作为抗炎因子,可抑制单核巨嗜细胞分泌前炎症性细胞因子和下调有细胞毒性的单核功能,与 IL-4 或 IL-10 联合具有协同抗炎作用^[12-13]。另外,越来越多的研究表明^[14-16] NF-κB 作为一种调节各种炎症细胞因子、趋化因子、黏附因子的转录调节因子,具有转录激活功能,其活化异常是 UC 的病理生理学机制之一。

本研究发现,高剂量安肠愈疡汤具有明确治疗 UC 的作用,不仅可使 UC 大鼠的结肠组织黏膜得到明显修复与改善,并可升高 IL-13 的含量,降低 IL-6 的含量,同时还能明显降低 NF-κB 的表达。由此推测,安肠愈疡汤可是通过抑制 NF-κB 的表达,减弱了其作为启动蛋白的炎性反应链的扩大,减少促炎症介质的释放,发挥抗炎作用。另一方面,安肠愈疡汤还通过增加保护因子的释放,从而达到防治 UC 的作用。然而这些细胞因子是直接作用于肠道黏膜组织而发挥修复作用还是通过抑制 TLR4/NF-κB 通路的信号转导和炎性反应而发挥增强粘膜修复的作用,其深层机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemon H. [Thecytokines in inflammatory bowel disease] [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2009

- (63):389-394.
- [2]王新月,王建云. 溃疡性结肠炎中医药治疗的关键问题与优势对策[J]. 中华中医药杂志,2012,27(2):263-266.
- [3]Wang Y,Ouyang Q. APDW 2004 Chinese IBD workinggroup. Ulcerative colitis in China;retrospective analysisof 3100 hospitalized patients [J]. J Gastroenterol Hepatol,2007,22(9):1450-1455.
- [4]APDW 2004 Chinese IBD Working Group. Retrospective analysis of 515 cases of Crohn's disease hospitalization in China;Nationwide study from 1990 to 2003 [J]. JGastroenterol Hepatol,2006,21(6):1009-1015.
- [5]迟莉丽,隗继武. 安肠愈疡汤口服合生肌散灌肠治疗溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 山东中医药大学学报,2004,28(6):448.
- [6]迟莉丽. 安肠愈疡汤口服合味生肌散灌肠对实验性溃疡性结肠炎大鼠的影响[J]. 中华中医药杂志,2009,24(10):1337-1339.
- [7]石敏,迟莉丽. 安肠愈疡汤合加味生肌散对实验性溃疡性结肠炎大鼠的药效学研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(9):2286-2288.
- [8]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.
- [9]Hristine C, Michel C, Lecannu G. The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats [J]. J Nutr,2003,133(1):21-27.
- [10]AleksandraNielsenA, NederbyNielsenJ, SchmedesA, etal. SalivaInterleukin-6inpatientswithinflammatoryboweldisease [J]. ScandJGastroenterol,2005,40(12):1444-1448.
- [11]锁堂,吴焕淦,施达仁. 白介素与溃疡性结肠炎[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(4):405-411.
- [12]曹秀红,张学彦,张晓娜. 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(30):3143-3148.
- [13]高伟,司雁菱,吴瑜. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜中 IL-10、IL-13 表达变化及意义[J]. 山东医药,2010,50(11):80.
- [14]梁海清,李俊玲. NF- κ B 在 UC 中的作用[J]. 国际消化病杂志,2008,28(1):40.
- [15]马天宇,富光明,俞腾飞. 核因子- κ B 与溃疡性结肠炎相关性的研究进展[J]. 国际消化病杂志,2014,34(5):307-312.
- [16]黄晓燕,张涛,宋雅芳. 温肾降浊化瘀方对溃疡性结肠炎 CD14/TLR4-NF-B 通路的影响[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(14):1229-1233.

(2015-07-12 收稿 责任编辑:张文婷)

何嘉琅获“中华之光—传播中华文化年度人物”

日前,世界中医药学会联合会主席团执行委员,意大利中华医药学会主席何嘉琅经意大利前总理朱利亚诺·阿马托先生推介,获得2015“中华之光—传播中华文化年度人物”奖,表彰其助推中医在意大利和欧洲的传播。

何嘉琅出生于中医世家“浙江何氏妇科”,1993年定居意大利,20多年来潜心推广传播中医药,推动罗马大学医学院开设中西医结合研究生课程,被境内和意大利多所大学聘为客座教授。他还牵头组织意大利的中医、中西医结合大夫和汉学专家出版《中医基本名词术语中意对照国际标准》,

成为意大利乃至欧洲影响最大的中医推广者之一。他表示,“把中医药在世界各地发扬光大是对中医药最好的继承,我们要让本土原创医学——中医药成为世界主流医学的重要组成部分”。

《中华之光——传播中华文化年度人物评选》活动,是由中国国务院新闻办公室、国务院侨务办公室、文化部、中国人民对外友好协会、孔子学院总部/国家汉办与中国文联共同主办,中央电视台承办。活动主要表彰为传播中华文化作出重大贡献的海外侨胞、台港澳同胞和国内各界知名人士。