

益气解毒方对急性期与慢性期溃疡性结肠炎大鼠 TNF- α 水平的影响

常孟然 林 燕 李文静 赵程博文

(北京中医药大学基础医学院,北京,100029)

摘要 目的:探讨益气解毒方对急性期和慢性期溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)大鼠血清 TNF- α 水平的影响。方法:利用家兔结肠黏膜-TNBS/乙醇的免疫复合法造模,将 100 只大鼠随机分为正常组、模型组(各 30 只)、益气解毒组和西药组(各 20 只),观察急性期与慢性期的疗效并检测血清 TNF- α 水平。结果:造模完成后,模型组 TNF- α 水平明显高于正常组($P < 0.01$),急性期和缓解期与造模后第 1 天相比有所降低($P < 0.05$),但仍显著高于正常组($P < 0.01$)。在急性期,益气解毒组与西药组的水平均低于模型组($P < 0.05$),高于正常组($P < 0.05, P < 0.01$);西药组低于益气解毒组($P < 0.05$)。在缓解期,益气解毒组与西药组水平保持下降,与正常组有统计学意义($P < 0.05$),与模型组统计学意义明显($P < 0.01$),2 用药组间的水平相当。益气解毒组的水平在缓解期显著下降,明显低于其急性期($P < 0.05$)。在缓解期与急性期相比下降幅度方面,益气解毒组较美沙拉嗪明显。结论:益气解毒方与美沙拉嗪整体效果相当,美沙拉嗪能够发挥良好的抗炎效果,适用于急性炎症损伤期,益气解毒方抗炎效果稍逊于美沙拉嗪,但在加快溃疡的愈合及黏膜修复增生的速度方面已达到美沙拉嗪水平,在抗炎与调节免疫功能上优于美沙拉嗪。

关键词 溃疡性结肠炎;TNF- α ;益气解毒方;急性期;慢性期

The Effect of Yiqi Jiedu Formula on the Serum Levels of TNF- α in the Acute and Chronic Phase in Rats with Ulcerative Colitis

Chang Mengran, Lin Yan, Li Wenjing, Zhaocheng Bowen

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

Abstract Objective: To study the effect of Yiqi Jiedu formula on the serum levels of TNF- α during the acute and chronic phase in rats with ulcerative colitis (UC). **Methods:** Using immune and chemical methods (rabbit colonic mucosa sensitized and TNBS/50% alcohol coloystered) to acquire UC models, then randomly divide one hundred rat models into four groups: normol group (30), model group(30), Yiqi Jiedu formula group(20) and mesalazine group(20). To observe the curative effect and test the serum level of TNF- α during the acute and chronic phase of UC. **Results:** After acquired UC rat model, the serum level of TNF- α in model group is significantly higher than the normal group($P < 0.01$). Compared with the first day of modeling, the level in the acute and chronic phase is lower in the UC rat model($P < 0.05$), but it is significantly higher than that of the normal group($P < 0.01$). In the acute phase, the serum TNF- α levels of Yiqi Jiedu formula group and mesalazine group are lower than the model group($P < 0.05$), but is higher than that of the normal group($P < 0.05, P < 0.01$). Moreover, the level of the mesalazine group is lower than that of the Yiqi Jiedu formula group($P < 0.05$). In the chronic phase, the serum TNF- α levels of Yiqi Jiedu formula group and mesalazine group kept falling. The difference of both groups between the normal group decreased($P < 0.05$), while the level are still significantly higher than the normal group($P < 0.01$). However, the gap between the two groups are narrow. The decrease degree of Yiqi Jiedu formula group is more obvious in acute phase than chronic phase($P < 0.05$). In regards to the decrease gap between the acute phase and chronic phase, the Yiqi Jiedu formula group is significantly greater than that of the mesalazine group. **Conclusion:** The overall effect of Yiqi Jiedu formula is similar to mesalazine. Mesalazine can play a well role on controlling inflammation, so it can be used in acute phase. While in the respect of accelerating UC cicatrization and repairing mucosa hyperplasia, Yiqi Jiedu formula is equal to masalazine and it out performed mesalazine in anti-inflammation and strengthening immunity.

Key Words Ulcerative colitis; TNF- α ; Yiqi Jiedu formula; Acute phase; Chronic phase

中图分类号:R242;R285;R516.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.029

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目——基于线粒体能量代谢探讨溃疡性结肠炎脾虚为本的病理基础(编号:81202682)

作者简介:常孟然(1986.07—),男,在读硕士研究生,主要从事中医药治疗消化系统疾病研究,E-mail:changmengran@126.com

通信作者:林燕(1977.02—),女,医学博士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中医理论指导下的消化系统疾病的病理机制与疗效机理研究,E-mail:yanlin77211@163.com

UC 是一种慢性非特异性结肠炎症,临床表现以反复发作的腹痛、腹泻、黏液脓血便和里急后重为主。中西医均可较好地改善活动期症状,控制发作,但该病以活动期与缓解期反复交替为特征,复发率高^[1],如何有效地预防复发成为临床研究的重点。目前的预防复发研究多停留在活动期,临床多强调活动期的治疗,对于缓解期的维持治疗没有给予充分的重视,缺乏缓解期病理机制的深入探讨。本课题从缓解期入手,探讨益气解毒方对 UC 不同时期的临床疗效与疗效机制,旨在为中医辨证论治、不同时期的合理有效治疗提供依据。大量免疫学研究表明,TNF- α 活动期与缓解期表达水平均有不同程度的升高,使体内免疫调节失衡,从而诱发 UC^[2-3]。所以,本文将 TNF- α 作为课题研究的重要免疫指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠 100 只,雄性,SPF 级,体重 180 g 左右,由北京斯贝福实验动物有限公司提供(动物许可证号 SCXK(京)2012-0001)。实验用家兔 12 只,雄性,体重 2 kg 左右,由北京兴隆动物养殖有限公司提供(动物许可证号 SCXK(京)2011-0006)。

1.2 主要试剂 三硝基苯磺酸(TNBS)和完全弗氏佐剂(Sigma);BCA 蛋白浓度测定试剂(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);无水乙醇、水合氯醛、4%多聚甲醛溶液(国药集团化学试剂北京有限公司);TNF- α 试剂盒(NOVUS,北京百诺威生物科技有限公司)。

1.3 分组与造模 将 Wistar 大鼠随机分成正常组、模型组、益气解毒组和西药组,其中正常组和模型组各 30 只,益气解毒组和西药组各 20 只。本实验利用免疫复合法^[4-5]获取大鼠 UC 模型,前 3 周每周给予家兔结肠黏膜制成的抗原乳化液(含异体抗原 8 mg,与等体积完全弗氏佐剂混均)注射 1 次,共注射 3 次,第 4 周用 TNBS + 50% 乙醇灌肠(100 mgTNBS/kg)。该 UC 大鼠模型病变特点与人类相似,急性期与慢性期特征明显,病变周期长,病变稳定性好,符合本实验需要。造模成功后,各治疗组分别以相应药物予以治疗,正常组、模型组用洁净水灌胃,1 次/d。益气解毒方以黄芪四君子汤合芍药汤加减组方;西药组用美沙拉嗪肠溶片,将其研碎配成混悬液。灌胃剂量均依据成人临床拟用量,通过体表面积换算,按正常人体体重 8 倍给药治疗。

1.4 取材 造模后第 1 天随机选取正常组与模型组各 10 只,给药治疗后第 2 周末、第 6 周末各治疗

组随机选取 10 只取材。以 3.5% 水合氯醛腹腔麻醉后解剖,腹主动脉采血,静置 2 h 后离心取血清,用 TNF- α 试剂盒检测血清中的含量,严格按照试剂盒说明书操作。

1.5 统计方法 应用 SPSS 20.0 统计软件对各项数据进行分析,实验结果($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

光镜下可见 TNF- α 表达的阳性细胞,其包浆为棕黄色着色,背景为淡黄色,每组选择 6 个切片,每个切片随机检测 5 个染色较好的高倍视野,运用 IPP 图像分析软件计算每个视野的阳性表达量,5 个视野的均数即代表该样本的阳性表达量,值越高,提示表达越强。

造模完成后,第 1 天、第 2 周、第 6 周模型组的 TNF- α 水平明显高于正常组($P < 0.01$),第 2 周、第 6 周与造模后第 1 天相比有所下降,第 6 周与第 1 天、第 2 周相比差异有统计学意义($P < 0.01$),但仍明显高于正常组($P < 0.01$)。益气解毒组第 2 周高于正常组($P < 0.01$),低于模型组($P < 0.05$);第 6 周也高于正常组($P < 0.05$),低于模型组($P < 0.01$);第 6 周低于第 2 周($P < 0.01$)。美沙拉嗪组第 2 周高于正常组($P < 0.05$),低于模型组($P < 0.05$);第 6 周也高于正常组($P < 0.05$),低于模型组($P < 0.01$);第 6 周略低于第 2 周。在急性期,益气解毒组与美沙拉嗪组的水平均低于模型组($P < 0.05$),高于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$);美沙拉嗪组低于益气解毒组($P < 0.05$)。在缓解期,益气解毒组与美沙拉嗪组水平持续下降,与正常组有统计学意义($P < 0.05$),与模型组差异有统计学意义($P < 0.01$),2 用药组间的水平相当,无统计学意义。见表 1。

表 1 大鼠结肠组织 TNF- α 表达的比

组别 例数=10	造模后第 1 天	第 2 周	第 6 周
正常组	41.09 ± 13.01 ^{△△}	41.61 ± 14.01 ^{△△}	42.79 ± 15.64 ^{△△}
模型组	187.41 ± 34.98 ^{**}	169.12 ± 31.79 ^{**}	140.01 ± 30.03 ^{**■}
益气解毒组		123.91 ± 18.11 ^{**□}	87.01 ± 16.70 ^{*△△■}
美沙拉嗪组		98.85 ± 15.60 ^{*△▲}	90.94 ± 15.85 ^{*△△}

注:与同时期正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与同时期模型组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与同时期益气解毒组比较: $\blacktriangle P < 0.05$;与同时期美沙拉嗪组比较: $\square P < 0.05$;与同组第 2 周比较: $\blacksquare P < 0.05$, $\blacksquare\blacksquare P < 0.01$ 。

3 讨论

UC 是以直肠、结肠黏膜与黏膜下层炎症为主要特征的病变,病程呈慢性经过,活动期与缓解期交

替,少数症状持续并逐渐加重。中医认为脾虚为本,湿热、瘀血为标是 UC 的主要病机。活动期由于湿热毒邪蕴结于肠道,与气血相搏结,导致脂膜血络受损,肠道传导失司,从而导致腹泻、腹痛、黏液脓血便、里急后重,结肠在镜下表现出结肠黏膜充血水肿、糜烂溃疡、炎性细胞浸润的病理改变。由于正邪相争,正气愈虚,日久由脾及肾,正气无力驱邪外出,湿热瘀血等毒邪内伏于人体,导致 UC 病程呈慢性、持续性发展。缓解期虽无明显症状表现,但湿热和瘀血积滞留滞于肠道局部,结肠黏膜损伤持续存在,成为 UC 反复发作的主要原因^[6]。可见脾虚与毒邪贯穿 UC 的始终,是 UC 的主要矛盾,成为导致 UC 发生、发展和复发的关键。治疗方面,现代用药多集中在活动期,往往忽视缓解期的治疗,近一时期,国内医学界对 UC 缓解期重要性的认识程度有所提高。在 2007 年中华医学会消化病分会制定的《对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》中,强调 UC 缓解期的治疗意见是所有患者完全缓解后均应维持治疗^[7],故本课题选用美沙拉嗪治疗,其治疗 UC 疗效显著,可以有效降低体内炎性因子的水平,同时具有较高的安全性^[8-9]。中医的辨证论治及整体观应用在 UC 缓解期的治疗上具有一定的优势,根据缓解期脾虚为本,但湿热和瘀血积滞内伏于肠道局部为标的病机特点,治疗上应着重益气健脾,并佐以清热利湿^[10]。本课题以导师治疗 UC 的临床经验,用黄芪四君子汤益气健脾,合芍药汤加减清利肠道湿热,方中黄芪、党参益气健脾,共为君药。茯苓甘淡利湿、健脾止泻,白术健脾益气、燥湿利水,黄连清热燥湿、厚肠止痢,连翘、蒲公英清热解毒、消痈散结,共为臣药。当归养血和血,木香行气调中止痛,寓“行血则便脓自愈,调气则后重自除”之意,焦三仙消食导滞,炙甘草甘温益气、调和诸药,共为佐使。本方的组方思路立足于本病的宏观病机和微观病理因素,辨病与辨证相结合,在益气健脾的基础上配以清热解毒药物,扶正祛邪同治,尤其针对缓解期脾气虚弱、毒邪留滞的病机,可有效修复肠上皮细胞的结构损伤、纠正免疫紊乱、减轻炎症反应、加快局部血液循环、促进溃疡愈合,达到延缓复发的目的。

本课题将 TNF- α 作为评价 UC 免疫学损伤的一项重要指标, TNF- α 是介导肠上皮增殖和凋亡的关键调节因子,也是参与肠道炎症起始与持续的重要炎症递质^[11],主要参与局部炎症反应、调节固有免疫^[12]。UC 自身免疫失调可诱导促炎症细胞因子如 TNF- α 产生等促进炎症产生和加重。UC 发生后,

TNF- α 大量分泌,主要在结肠黏膜局部发生作用,可以诱导大量肠上皮细胞凋亡^[13-14]。它作为炎症介质,通过促使其他细胞因子的释放,以及活化内皮细胞参与黏膜固有层的炎性反应,炎症导致大肠黏膜对水、钠吸收障碍以及结肠运动功能失常,所以 UC 患者腹泻,如黏膜炎性渗出、糜烂及溃疡,则便黏液脓血。如治疗不彻底,致炎因子持续或反复作用于机体,不断损伤组织,急性炎症可转为慢性炎症,以致炎症时轻时重,迁延不愈。TNF- α 还能够提高血管壁的通透性,减少血栓调节素的释放,促进血栓形成,使机体处于促凝血状态,形成微血栓,造成微循环障碍^[15],由于局部血流缓慢,组织缺氧,继而引起毛细血管充血、水肿,腹部有轻度或中度疼痛。鉴于 TNF- α 在 UC 发生发展过程中的重大作用,故将 TNF- α 作为一项监测指标,对 UC 的活动诊断、疾病分期、活动情况及预后判定有重要意义。

从光镜病理结果及检测各组 UC 大鼠 TNF- α 水平数据显示,UC 发病后,结肠黏膜的 TNF- α 表达水平显著增高,各时期模型组水平均高于正常组,随时间推移有下降的趋势,但仍然显著高于正常组($P < 0.01$);在第 2 周和第 6 周益气解毒组与西药组的水平均低于模型组($P < 0.05$),高于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$),第 2 周西药组低于益气解毒组($P < 0.05$),第 6 周益气解毒组低于西药组,但无统计学意义。益气解毒组内第 6 周相比第 2 周下降明显($P < 0.01$),西药组内第 6 周相比第 2 周有所下降。急性期美沙拉嗪可明显减少炎性细胞的浸润情况,益气解毒方急性期减少炎性细胞的能力稍逊于美沙拉嗪,但已经开始出现上皮修复增生情况,溃疡较快地被成熟的肉芽组织所取代。而缓解期美沙拉嗪组开始表现出溃疡愈合,上皮增生性修复和形成肉芽肿,此时益气解毒方的修复愈合效果与美沙拉嗪组相当。从整体药效评价来看,上述实验说明美沙拉嗪能够发挥良好的抗炎效果,适用于急性炎症损伤期,益气解毒方抗炎效果稍逊于美沙拉嗪,但在加快溃疡的愈合及黏膜的修复增生的速度方面已达到美沙拉嗪水平。

参考文献

- [1] 许子瑞. 101 例溃疡性结肠炎临床分析[D]. 北京:北京中医药大学, 2010.
- [2] 易蕊,常娟,刘晓艳,等. TNF- α 、IL-6 及 IL-8 在不同程度溃疡性结肠炎患者血清中的表达及意义[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(14): 2641-2644.
- [3] 郑海涵,吴正祥. TNF- α 在 IBD 发病机制中的调节[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(2): 191-193.

[4] 徐阳,李伟光,刘海峰,等. 三硝基苯磺酸诱导小鼠溃疡性结肠炎模型制备的技术改良[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(2):106-112.

[5] 惠毅,闫曙光,李京涛,等. 大鼠慢性溃疡性结肠炎模型建立方法探讨[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(10):62-65.

[6] 林燕. 解毒化痰中药灌肠对溃疡性结肠炎活动期及缓解期炎症反应的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2014,22(2):61-64.

[7] 欧阳钦,胡品津,钱家鸣,等. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 胃肠病学,2007,12(8):488-495.

[8] 韩玉龙. 美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎疗效及对炎性因子的影响[J]. 临床医药文献电子杂志,2015,2(1):38-39,41.

[9] 董力,王建,贾晨虹. 美沙拉嗪缓释颗粒治疗溃疡性结肠炎的疗效及对患 TNF- α 、IL-8 的影响[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(24):53-56.

[10] 王新月,田德禄. 溃疡性结肠炎病因病理特点与中医辨治思路对策[J]. 北京中医药大学学报,2007,30(8):554-555 + 559.

[11] 师永盛,霍丽娟,安丽婷. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜 COX-2 和 TNF- α 的表达及其意义[J]. 山西医科大学学报,2011,42(4):327-329.

[12] 周婷,林平,潘慧,等. 溃疡性结肠炎发病机制及其研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(11):1782-1786.

[13] 贾长河,许泼实,康谊. 溃疡性结肠炎患者血清 IL-8、IL-10、TNF- α 的水平及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2008,22(8):574-575,578.

[14] 王亚军,吕永慧,董晶,等. 溃疡性结肠炎中医辨证分型与 TNF- α 的相关性研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2014,22(9):525-528.

[15] 严瑾,欧阳钦,刘卫平,等. 肿瘤坏死因子- α 在溃疡性结肠炎中的表达及其作用探讨[J]. 胃肠病学,2005,10(5):17-20.

(2015-09-07 收稿 责任编辑:徐颖)

第十三届世界中医药大会“一带一路”中医药文化周(大洋洲·2016)

The 13th Word Congress of Chinese Medicine OBOR TCM CULTURE WEEK(Oceania·2016)

第一轮通知

2016年11月10日-17日·大洋洲

各位专家、各位同仁:

由世界中医药学会联合会主办的世界中医药大会是全球中医药领域规模大、参与广、层次高的学术盛会。至今已在中国、法国、加拿大、新加坡、中国澳门、澳大利亚、荷兰、英国、马来西亚、美国、俄罗斯、西班牙成功举办了十二届。第十二届世界中医药大会期间首次举办“一带一路”中医药文化周系列活动,为中医药在欧洲的发展搭建了广阔的平台。

“第十三届世界中医药大会暨‘一带一路’中医药文化周”,将于2016年11月10-17日在新西兰奥克兰市、澳大利亚墨尔本市举行。活动期间,来自世界各地的中医药专家学者、政府官员、企业家将分享他们的理论研究和临床经验、科研成果和新发明新创造,大会附设中医药服务贸易展览会。活动期间将组织多种形式的学术考察调研活动。

现就有关事宜通知如下:

一、地点:新西兰·奥克兰市、澳大利亚·墨尔本市

二、主题:继往开来,新世纪中医药更美好!

三、会议主要议题及征文内容:(征文要求见附件)

1. 中医药基础理论研究;

2. 中医药临床实践:临床研究方法创新与进展、临床疗效评估体系研究、老中医临证经验总结、特色疗法体会及推广、中医养生保健治未病研究等;

3. 针灸推拿研究实践:针药配合临床研究、特殊针法临床经验介绍、中医针灸治疗在区域性疾病治疗中的特色与优势等;

4. 中药研究:中药方剂学、临床配伍研究、中药应用及研究等;

5. 中西医结合研究:理论创新、最新进展、实践创新、经验总结;

6. 中医手法流派的传承与发展;

7. 中医药国际化、信息化研究;

8. 中医药在世界各国的发展及立法情况,各国中医教育动态、教育制度现状及科研情况;

9. 中医药文化与非物质文化遗产保护;

10. 道地药材与濒危珍稀动植物保护。

11. 中医药服务贸易理论研究与实践及经验交流。

四、参会人员:

相关国家政府官员,各国中医药、传统医药、中西医结合、现代医药及相关领域从事医疗、教育、科研、管理、生产、贸易的专家学者和企业家,世界中联各国会员。

五、会议安排:

1. 学术会议:开、闭幕式,主题演讲,分会场专题报告,现场演示工作坊,欢迎晚宴。

2. 中医药服务贸易展览会:每个展位:3 m × 3 m,1 张桌子,2 把座椅,1 个插座,基本照明,免 2 人参会注册费。

3. 大会特刊:为了珍藏这一重要活动,将制作《第十三届世界中医药大会特刊》,收录具备一定资质的机构和个人。本次大会特刊将赠与我 65 个国家的 246 个会员团体、各国驻华使馆、我国驻外使馆及有关国际组织和相关机构收藏。欢迎报名申请,费用另行通知。

4. 参会者可授予国家级继续教育二类学分证书 6 分,如有需要,请提前告知大会组委会。

5. “一带一路”中医药国际交流考察:具体安排请咨询世界中联国际联络部。

六、重要日期:

2016年7月1日大会注册费优惠截止。

2016年7月31日大会论文投稿截止。

七、会议咨询、报名处:世界中医药大会组委会已开始接受报名,联系方式如下:

世界中医药大会办公室(国际联络部):邱珺、杨柳、潘眩、税毅强
电子邮箱:wccm@vip.163.com,电话:010-58650243/58650240/58650026/58650058

世界中医药大会组委会

2015年11月16日