

实验研究

肠愈宁对溃疡性结肠炎大鼠炎症因子及钙卫蛋白释放的影响

王海强¹ 郑丽红² 朱峰³ 刘朝霞¹ 王静滨¹ 张杨¹ 梁国英¹ 刘金狄³ 张月涛³

(1 黑龙江中医药大学附属第一医院,哈尔滨,150040; 2 黑龙江中医药大学附属第二医院,哈尔滨,150001; 3 黑龙江中医药大学,哈尔滨,150040)

摘要 目的:研究肠愈宁颗粒对二硝基氯苯乙酸复合法诱导大鼠溃疡性结肠炎的作用,并初步探讨其作用机制。方法:将雄性SD大鼠分成6组:正常组、模型组、柳氮磺胺吡啶组(SASP)和肠愈宁颗粒低、中、高剂量组。以二硝基氯苯乙酸复合法诱导大鼠溃疡性结肠炎模型。评估疾病活动指数(DAI)、结肠黏膜损伤指数(CMDI)和病理组织学。ELISA方法测定血清IL- β 、TNF- α 、钙卫蛋白(Calprotectin, CP), Western blot方法检测结肠黏膜CP的表达水平。结果:DAI结果提示造模成功,与正常组比较,模型组血清中IL- β 、TNF- α 、CP均明显升高,而CMDI指数、结肠黏膜CP均明显升高。肠愈宁颗粒各组DAI、CMDI、结肠组织中黏膜CP均降低,血清中IL- β 、TNF- α 、CP水平也明显降低。结论:肠愈宁颗粒能够有效缓解二硝基氯苯乙酸复合法诱导的大鼠溃疡性结肠炎,其作用机制可能与下调IL- β 、TNF- α 表达,减少CP水平有关。

关键词 肠愈宁;溃疡性结肠炎;IL- β ;TNF- α ;CP

Effects of Changyuning on Inflammatory Factors and the Release of Calprotectin in Rats with Ulcerative Colitis

Wang Haiqiang¹, Zheng Lihong², Zhu Feng³, Liu Zhaoxia¹, Wang Jingbin¹, Zhang Yang¹, Liang Guoying¹, Liu Jindi³, Zhang Yuetao³

(1 The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2 The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, China; 3 Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract Objective: To study the effects of Changyuning Granule (CYN) on ulcerative colitis induced by dinitrochlorobenzene/ethanoic acid in rats, and to explore its mechanism. **Methods:** Male SD rats were divided into 6 groups: the normal group, the model group, the low, medium and high dose group of CYN and the sulfonamide group (SASP). The ulcerative colitis model was induced by dinitrochlorobenzene/ethanoic acid. Disease activity index (DAI), colonic mucosa damage index (CMDI) and pathological histology were assessed. Serum IL- β , TNF- α , and calcium protein (Calprotectin, CP) were detected by ELISA. The expression of CP in colonic mucosa was detected by Western blot. **Results:** DAI results suggested that the model was successful. Compared with the normal group, IL- β , TNF- α , and CP in the serum of the model group were significantly increased, and the index of CMDI, colonic mucosa CP were significantly increased. The DAI, CMDI, and mucosal CP in the colon tissue of each group of Changyuning Granules were decreased, and the levels of IL-, TNF-, and CP in serum were also significantly decreased. **Conclusion:** CYN Granule can effectively relieve the ulcerative colitis induced by dinitrochlorobenzene/ethanoic acid in rats. The mechanism may be related to down-regulation of IL- β and TNF- α expression and reduction of CP level.

Key Words Changyuning; Ulcerative Colitis; IL- β ; TNF- α ; CP

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.10.045

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)属于炎症性肠病之一,其发病机制尚不明确,临床症状表现为腹痛、腹泻、里急后重、黏液脓血便等^[1]。目前,临床上治疗UC主要以糖皮质激素和水杨酸制剂为主,代表药有柳氮磺胺吡啶和美沙拉嗪,但是不良反应

大,无法长期服用。现代医学研究表明,免疫失衡在UC发生过程中起关键作用,过度活化的效应细胞产生的抗体、炎症反应介质、细胞因子引起炎症病变导致组织破坏^[2]。二硝基氯苯模型是一个典型的胃肠道迟发变态反应模型,其原理为长期存在的外源性

抗原或机体自身抗原激活机体的免疫系统,产生细胞免疫反应,直接诱发或加重 UC^[3]。

本实验室经历了近 10 多年的临床和实验课题研究,在方法中归纳出清热解暑,健脾燥湿法治疗本病,并经过反复摸索研制出经验方剂肠愈宁颗粒,在临床实践中肠愈宁颗粒治疗 UC 取得了良好的疗效,而且其安全性良好。本实验用 DNBS 诱导 SD 大鼠 UC 模型,研究 UC 大鼠在肠愈宁颗粒干预下 CP 在结肠黏膜、血清中的表达的变化和差异,同时结合相关炎症介质进一步阐明肠愈宁颗粒对 UC 进行有效的阻断和治疗,并提供科学的理论依据

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 60 只,均为雄性,体重(250 ± 15)g,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。实验动物许可证号:SCXK(黑)-2014-0003。

1.1.2 药物 2,4-二硝基氯苯(DNCB):由上海安诺方胺化学品公司生产。肠愈宁颗粒(白头翁,黄连,黄芩,赤石脂,焦白术等)组成。由江苏天阴药业生产。柳氮磺胺吡啶(SASP)(上海三维制药有限公司,生产批号:07051)。用前研碎,用生理盐水配置成混悬液。

1.1.3 试剂与仪器 VICTOR X3 酶标仪,美国 PerkinElmer 公司;BI-496 2000 医学图像分析系统,成都泰盟科技有限公司;BT 25S 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;HWS24 恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;电泳仪,上海精密仪器仪表有限公司,高速台式离心机,科大创新股份有限公司,凝胶成像分析系统。OML-QPA 型生物组织切片机,湖北欧美莱医疗科技有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 采用二硝基氯苯乙酸复合法制备大鼠 UC 模型。将 60 只 SD 大鼠随机分成实验组 50 只和正常组 10 只。实验组大鼠背部剃毛后,用 2% 2,4-二硝基氯苯丙酮溶液滴背部,1 次/d,每只鼠 5 滴/次,连续 14 d 致敏。15 d 向肛内约 6 cm 处的结肠腔内用 1% 2,4-二硝基氯苯乙醇液保留灌肠 0.35 mL,于 16 d 在同部位注入 0.1% 乙酸溶液 2 mL,准确计时 15 s 后,再用 5.0 mL 生理盐水冲洗。造模前后均给予大鼠高脂饮食。17 d 随机抽取 2 只造模大鼠处死,取其结肠标本,病理检查确认有充血,水肿及典型溃疡形成即为造模成功。

1.2.2 给药方法 各观察组均于造模后 1 d 给予

相应药物灌胃,连续两周。在建立 UC 病变动物模型的同时,肠愈宁高剂量组、中剂量组、低剂量组(CYN-L,CYN-M,CYN-G)分别灌服相当于生药量为 1 g/mL、2 g/mL、4 g/mL 的肠愈宁颗粒溶液 10 mL/(kg · d)。柳氮磺胺吡啶对照组(SASP):灌服相当于生药量为 0.2 g/(kg · d)柳氮磺胺吡啶悬浊液 10 mL/(kg · d),药物均溶于质量分数为 0.5% CMC 溶液,超声溶解。而空白对照组、模型对照组给予等量生理盐水灌胃 10 mL/(kg · d),在第 31 天处死大鼠并取材。

1.2.3 检测指标与方法 疾病活动指数(Disease Activity Index,DAI)参考文献^[4]的方法,分别观察大鼠体重、大便性状及血便变化,具体计分标准见表 1。

表 1 大鼠 DAI 评分标准

体重下降	大便状态	有无血便	分值
无	正常	潜血阴性	0
1% ~ 5%			1
6% ~ 10%	半稀便	潜血阳性	2
11% ~ 15%			3
>15%	稀便	肉眼血便	4

表 2 结肠黏膜损伤程度(CMDI)评分标准

肉眼观察结肠特征	得分
无损伤	0
黏膜充血,水肿,未出现溃疡	1
黏膜充血,水肿,轻度糜烂,无溃疡	2
黏膜充血,水肿,中度糜烂,单个溃疡	3
黏膜充血,水肿,高度糜烂,多个溃疡	4
黏膜充血,水肿,重度糜烂,>1 cm 溃疡	5

结肠黏膜损伤程度(CMDI)及病理学评价:实验结束后,腹主动脉取血之后,立即解剖结肠,沿肠系膜纵轴剪开肠腔,用生理盐水清洗干净。参考文献^[5]的标准,对各组结肠黏膜损伤程度进行评分比较。于病变处剪取 0.6 mm × 2.5 mm 组织块,立即置于 10% 福尔马林固定液中固定,24 h 后进行石蜡包埋,连续切片,进行 HE 染色,光学显微镜下观察结肠黏膜形态。见表 2。

血清 IL-1 β 、TNF- α 和 CP 的活性检测:从大鼠腹主动脉取不抗凝血 3 ~ 5 mL,静置凝固后,4 ℃ 离心机内,3 500 r/min 离心 12 min,取上层血清,采用双抗夹心法 ELISA 测定大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 CP 的含量,按照试剂盒说明书规范操作。在检测波长 450 nm 处读板,通过标准曲线,利用回归方程计算含量。

表3 肠愈宁对 UC 大鼠 DAI 评分的影响($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	DAI 评分					
	d16	d17	d18	d22	d26	d30
正常组	0.9 ± 0.31	1.3 ± 0.16	1.1 ± 0.14	1.2 ± 0.19	0.7 ± 0.18	1.1 ± 0.22
模型组	8.2 ± 1.34**	8.4 ± 2.00**	8.9 ± 1.24**	7.5 ± 0.89**	5.9 ± 0.86**	5.4 ± 0.87**
SASP 组	7.7 ± 1.13	8.2 ± 1.65	8.4 ± 2.10	5.3 ± 1.45	3.6 ± 0.53 ^{△△}	1.9 ± 0.42 ^{△△}
CYN-L 组	8.5 ± 1.65	8.7 ± 1.73	9.1 ± 2.49	6.3 ± 0.91	4.2 ± 0.55 [△]	2.8 ± 0.61 ^{△△}
CYN-M 组	8.0 ± 1.32	8.0 ± 1.80	8.3 ± 1.80	4.8 ± 0.59 [△]	3.7 ± 0.53 [△]	2.5 ± 0.50 [△]
CYN-G 组	7.4 ± 0.98	8.5 ± 1.54	8.7 ± 1.74	5.3 ± 0.67	4.4 ± 0.46 [△]	2.0 ± 0.43 ^{△△}

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

Western blot 检测肠组织 CP 的表达:取病变最明显 2.0 cm × 3.0 cm 处,加裂解液用玻璃匀浆器将其磨碎,离心,后取上清液,送 -80 °C 冰箱冷藏。BCA 法测定总蛋白浓度,将提取的蛋白 25 μg 电泳,恒压 90 V 电泳至浓缩胶下部,恒压 125 V 电泳至分离胶底部;在恒流 50 mA 湿转 60 min,封闭 2 h 后,加入 1:3 000 稀释的鼠抗 CP 抗体,摇床上振摇 2 h,再加入 1:5 000 稀释的抗鼠和抗羊 IgG,摇床上振摇 1 h,Western blot 荧光显影仪进行扫描,曝光。应用 Image J 1.8.0 软件对蛋白条带进行灰度分析,计算条带灰度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠愈宁对 UC 大鼠 DAI 评分的影响 造模开始后,和正常组比较,造模组大鼠在造模几日之后出现稀便,觅食不主动,肛周污浊,食量减少,持续稀便,而后部分大鼠体重降低,有血便且肉眼可见,说明结肠出现不同程度的损伤和出血。肠愈宁颗粒低、中剂量组症状缓解缓慢,食量较少,扎堆、稀便及血便症状缓解不明显;肠愈宁高剂量组、SASP 组随着给药时间的延长,症状明显好转,大部分大鼠稀便症状消失,基本恢复正常,食量正常,活跃,粪便呈灰褐色颗粒状,体重略有回升。不同时间点大鼠的 DAI 分值。见表 3。

2.2 肠愈宁颗粒对 UC 大鼠结肠长宽及 CMDI 评分的影响 末次给药次日(造模后 22 d),正常组、模型组与各给药组在结肠长度上并无显著性差异。见表 4。正常组大鼠肉眼观察结肠黏膜无明显水肿、糜烂和溃疡形成。模型组大鼠肠壁可见明显的充血、水肿,结肠略微缩短;沿肠系膜纵向剖开可见肠壁黏膜,局部有糜烂、出血,并可找到明显的溃疡灶,病变主要累及远端结肠,CMDI 评分升高($P < 0.01$)。SASP 组和肠愈宁颗粒各剂量组大鼠肠黏膜

病变较模型对照组明显好转,呈溃疡愈合改变。结肠各指数均明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表4 肠愈宁颗粒对 UC 大鼠结肠长宽及 CMDI 评分的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	结肠长度(cm)	CMDI
正常组	18.48 ± 2.03	0.3 ± 0.17
模型组	16.84 ± 1.02	3.8 ± 0.42**
CYN-L 组	19.12 ± 1.45	2.7 ± 0.56 [△]
CYN-M 组	17.85 ± 1.82	2.1 ± 0.43 [△]
CYN-H 组	18.23 ± 1.04	1.8 ± 0.48 ^{△△}
SASP 组	17.64 ± 1.57	1.6 ± 0.54**

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

2.3 肠愈宁颗粒对 UC 大鼠结肠组织病理学的影响 光学显微镜下观察各组结肠组织病理切片。见图 1。正常对照组黏膜上皮完整,结构清晰,腺体整齐排列,杯状细胞丰富,隐窝形态正常,炎细胞无浸润,黏膜下层及肌层未见异常。模型组大鼠结肠黏膜缺失明显,固有层内腺体结构紊乱,杯状细胞减少,并有大量炎性细胞浸润,包括淋巴细胞、浆细胞、单核细胞;并伴有明显水肿。SASP 组和肠愈宁颗粒各剂量组的损伤程度均较模型组不同程度降低,可见大鼠结肠黏膜病变减轻,溃疡愈合,腺体排列尚规则,存在少量炎性细胞浸润且肠愈宁颗粒高剂量组与 SASP 组效果相当。

2.4 各组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 及 Calprotectin (CP) 的比较 与空白对照组比较,模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 以及 CP 的表达量显著上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而各剂量观察组以及阳性药组血清 IL-1 β 、TNF- α 及 CP 的表达均有不同程度的降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 2。

2.5 肠愈宁对肠组织中 CP 表达的影响 Western blot 检测结果表明,模型组大鼠肠组织中 CP 的表达较空白组显著升高($P < 0.05$)。见图 3。给药后,各组 CP 表达发生改变,肠愈宁组较模型组 CP 表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。且具有剂量依赖性,阳性药组的调节作用要稍优于肠愈宁组。

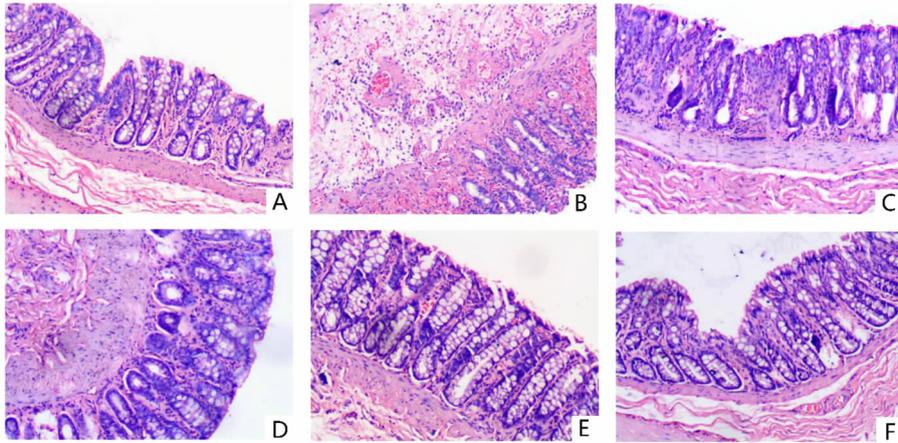


图1 肠愈宁颗粒对 UC 大鼠结肠组织病理学的影响 HE × 200

注: A: 正常组; B: 模型组; D: CYN-low; E: CYN-medium; F: CYN-high; C: SASP5

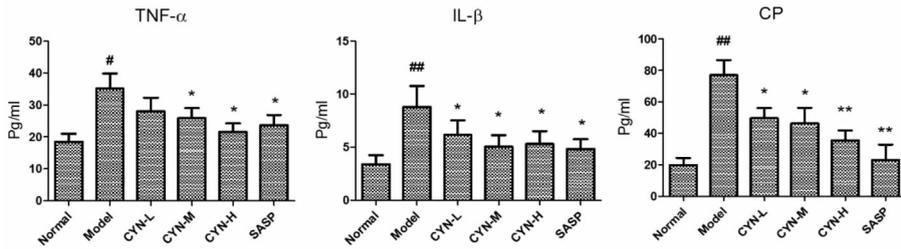


图2 各组大鼠血清 IL-1β、TNF-α 及 Calprotectin (CP) 的比较

注: ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs normal group; * $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs model group

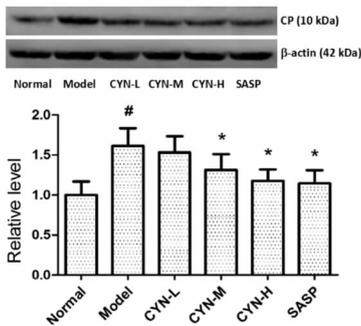


图3 肠愈宁对肠组织中 CP 表达的影响

注: ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs normal; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model

3 讨论

目前,对于 UC 西药尚缺乏强有效的干预手段, UC 的西药治疗如美沙拉嗪、4-氨基水杨酸等虽对病情有所控制,不良反应较大。其次是皮质类固醇,是临床治疗急性暴发型和重度溃结患者的首选药物,长期应用易产生不良反应且不能防止复发。再次是免疫抑制剂,对常规药物治疗无效的 UC 有一定疗效,但对肝、肾及骨髓有毒性^[6]。而中医药治疗溃结体现了较明显的优势,近些年中医药治疗溃结疗效显著,却无明显不良反应,体现出中药治疗溃结的优越性。我们经过近 20 余年的临床和实验研究总

结出经验方肠愈宁颗粒。肠愈宁颗粒组方源自金元医家刘完素的名方白术黄芪汤(《素问病机气宜保命集·泻痢论》),结合我科名中医治疗 UC 的临床经验配药而成,在临床应用取得了良好的效果,有效率达 90% 以上,而且安全性良好^[7]。本研究复制了的 UC 大鼠模型,并通过宏观和微观角度考察了 UC 大鼠肠道炎症反应,实验结果显示,肠愈宁颗粒调节了肠道异常免疫反应,使肠黏膜炎症反应和溃疡基本消除。佐证了肠愈宁颗粒的有效性。

UC 病因和病机尚不明确,但免疫异常被公认为在炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD)中发挥着决定性的作用,包括细胞因子、炎症反应递质以及免疫调节等方面^[8]。溃结与结肠癌的发生存在一定的因果关系,所以被 WHO 列为难治之病^[9]。细胞因子可分为抗炎性细胞因子和促炎性细胞因子两类,正常人群中两类因子处于平衡状态,有研究表明,当抗炎性细胞因子异常减少或促炎性细胞因子异常增多可导致二者平衡被打破,进而促使肠道黏膜炎症反应的发生^[10]

肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF) TNF-α 不仅具有抗肿瘤的活性,并且还能介导和调节机体的免疫反应、炎症反应、代谢等。TNF-α 通过

促进内皮细胞粘附分子上调、趋化中性粒细胞发挥凝血酶原效应的作用,进而参与 UC 的发生,活动期 UC,在血浆和粪便中均能检测到 TNF- α 的表达,且水平升高^[11]。IL-1 β 属内分泌型细胞因子,可由多种细胞产生,如巨噬细胞、单核、内皮细胞和中性粒细胞等。在免疫炎症反应中有重要作用。IL-1 β 具有较多的生物学活性,可以诱导淋巴因子的产生,活化 T 细胞、诱导急性期炎症反应免疫、蛋白质合成等。UC 活动期 IL-1 β 的表达上调,间接提示它对 UC 的发病起重要作用。

钙卫蛋白(Calprotectin, CP)是一种杂合性的钙结合蛋白,来源于中性粒细胞和活化巨嗜细胞胞质,可作为一种炎症标志物。其具有抗蛋白酶活性和耐热性,在外界环境中和肠腔可长期保持稳定而不被细菌和酶破坏,其主要生物学功能包括抗微生物活性、调节免疫作用、参与细胞信号传递、抗增殖和诱导细胞凋亡、炎症反应中调节蛋白等^[12]。国外研究表明钙卫蛋白的稳定性要好于以前的生物标记物,其浓度在 UC 活动期显著增加^[13]。UC 的研究,是目前免疫疾病防治研究的重点,依然存在着许多未解决的问题。钙卫蛋白作为调节蛋白在 UC 的防治中的相关研究极少。

本实验通过免疫印迹检测(Western blot)结肠组织 CP,同时酶联免疫法(Euzy Melinked Immunosorbent Assay, ELISA)检查相关炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 。结果表明模型组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 的表达明显高于空白对照组,说明促炎细胞因子参与了 UC 的发病。经过肠愈宁颗粒治疗两周后,实验大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 的表达较模型组显著减少。表明肠愈宁颗粒治疗 UC 的机制可能是通过抑制促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达,进而调整了促炎因子与抗炎因子的平衡。此外,在血清和肠组织中,肠愈宁颗粒组的 CP 的含量比较模型组有显著的降低。本研究从细胞免疫和 CP 调节角度阐述肠愈宁颗粒影响

UC 的发病机制。本文可以为进一步研究肠愈宁颗粒治疗 UC 的机制以及 UC 药物的开发提供理论依据。

参考文献

- [1] 何小华,陈建勇.炎症性肠病发病的相关免疫机制[J].南昌大学学报:医学版,2011,51(10):93-95.
- [2] 路晓红,杨恩来,赵霞,等.溃疡性结肠炎免疫机制的研究进展[J].山西中医学院学报,2011,12(1):66-68.
- [3] 朱毅,赵锦,陈国彪,等.海南砂仁挥发油对 2,4-二硝基氯苯与乙酸诱发的大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2009,23(5):388-394.
- [4] 王坤,宣秀敏,王莲,等.溃疡性结肠炎大鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的变化及相关性研究[J].安徽医科大学学报,2012,47(3):354-356.
- [5] Christine C, Michel C, Lecannu G. The prebiotic characteristics of fructooligo saccharides are necessary for reduction of TNBS induced colitis in rats [J]. J Nutr, 2003, 133(1):21-27.
- [6] 郑家驹.炎症性肠病的维持缓解治疗[J].中华消化杂志,2007,27(12):852-854.
- [7] 谢晶日,林静.肠愈宁颗粒治疗溃疡性结肠炎临床疗效观察[J].中国中西医结合消化杂志,2010,18(3):161.
- [8] 赵曼,高峰.溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J].现代医学生物进展,2011,11(16):170.
- [9] Nguyen GC, Tuskey A, Dassopoulos T, et al. Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in the United States between 1998 and 2004 [J]. Inflammatory bowel diseases, 2007, 13:1529-1535.
- [10] Brun JG, Haga HJ, Boe E, et al. Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity [J]. J Rheumatol, 1992, 19(6):859-862.
- [11] 王伟宁,张熙纯,刘丽.活动期溃疡性结肠炎发病机制的免疫学讨论[J].中国现代医学杂志,2003,13(16):74.
- [12] 王少东,汪芳裕,万海军,等.钙卫蛋白监测在炎症性肠病患者中的意义[J].胃肠病学和肝病学杂志,2010,19(11):1043-1044.
- [13] Lv H, Hao SY, Yan NB. Faecal calprotectin meaning differential diagnosis among inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, colorectal cancer [J]. Int J Lab Med, 2012, 33(21):2651-2652.

(2018-08-14 收稿 责任编辑:徐颖)