

· 经典名方 ·

探讨四神丸、白头翁汤、连理汤对溃疡性结肠炎大鼠的影响

巩子汉, 张玲, 刘丽梅, 卢贺起, 刘振丽, 柏冬, 王瑞海, 岳广欣*
(中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨温方(四神丸)、清方(白头翁汤)、温清并用方(连理汤)治疗溃疡性结肠炎(UC)的作用机制,比较温、清、温清并用方对UC大鼠的作用差异。方法:将90只清洁级SD大鼠随机分为正常组和造模组,造模组采用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠法复制UC模型,将造模大鼠按随机数字表法分为模型组,阳性药组(柳氮磺吡啶,SASP),四神丸组,白头翁汤组和连理汤组,共5组。正常组和模型组大鼠给予2 mL·d⁻¹蒸馏水灌胃,四神丸、白头翁汤和连理汤组分别给予1.76,1.40及2.13 g·kg⁻¹·d⁻¹的对应中药灌胃,SASP组给予SASP 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,各组给药量为2 mL·d⁻¹,干预14 d。对各组大鼠结肠黏膜损伤程度评分及病理、细胞因子芯片进行检测,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠血浆游离甲状腺激素(FT₃),胰高血糖素样肽-1(GLP-1),皮质酮(CORT)及结肠组织神经降压素(NT),P物质(SP),血管活性肠肽(VIP),生长抑素(SST)含量。结果:与正常组比较,UC大鼠结肠质量长度比及黏膜损伤评分显著升高($P<0.01$);出现大量淋巴细胞浸润、肠绒毛紊乱甚至消失等现象;组织中中性粒细胞趋化因子-1/2 α / β /3(CINC-1/2 α / β /3),白细胞介素-1 α (IL-1 α)及干扰素诱导蛋白10(IP-10)等因子含量显著升高($P<0.05$);血浆CORT, GLP-1含量显著降低($P<0.05$),组织SP含量显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠结肠黏膜损伤减轻,连理汤、四神丸组大鼠IL-1 α , IP-10,脂多糖诱导性C-X-C趋化因子(LIX),L选择素(L-selectin)等因子含量显著降低($P<0.05$),白头翁汤组大鼠CINC-3,白细胞介素-17(IL-17)等因子含量显著降低($P<0.05$),SASP组大鼠CINC-1/3, IL-1 α , IP-10等因子含量显著降低($P<0.05$);连理汤大鼠血浆FT₃含量显著升高,连理汤、四神丸及白头翁汤大鼠血浆GLP-1含量显著升高($P<0.05$);四神丸及白头翁汤大鼠结肠组织VIP含量显著降低($P<0.05$),SASP大鼠结肠组织SST含量显著升高($P<0.01$)。结论:连理汤、四神丸、白头翁汤对UC的干预较为明显,其作用机制可能通过调控细胞因子网络实现对炎症反应的抑制及免疫平衡实现的,且连理汤作用较为明显,四神丸次之,白头翁汤再次之。

[关键词] 四神丸; 白头翁汤; 连理汤; 溃疡性结肠炎; 细胞因子芯片; 大鼠

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211504

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210610.1043.002.html>

[网络出版日期] 2021-06-11 12:00

Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on Ulcerative Colitis in Rats

GONG Zi-han, ZHANG Ling, LIU Li-mei, LU He-qi, LIU Zhen-li, BAI Dong,
WANG Rui-hai, YUE Guang-xin*

(Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang in the treatment of ulcerative colitis (UC), and compare their efficacies on UC in rats. **Method:** Ninety SD rats of SPF grade were randomly divided into blank group (distilled water, 2 mL·d⁻¹) and experimental group. The rats in the experimental groups were administered with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) by clysis to

[收稿日期] 20210330(002)

[基金项目] 中国中医科学院自主选题项目(Z02028)

[第一作者] 巩子汉,在读博士,从事中医脾胃病及中医药防治情志病的临床与基础研究,E-mail:1217253647@qq.com

[通信作者] *岳广欣,博士,研究员,博士生导师,从事中医方证及精神行为病症的中医病理生理基础及防治研究,E-mail: yuegx73@hotmail.com

induce the UC model. Subsequently, the model rats were divided into a model group (distilled water, 2 mL·d⁻¹), positive group [sulfasalazine (SASP), 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹], Sishenwan group (1.76 g·kg⁻¹·d⁻¹), a Baitouweng Tang group (1.40 g·kg⁻¹·d⁻¹), and Lianlitang group (2.13 g·kg⁻¹·d⁻¹) according to the random number table. The rats in each group were dosed at 2 mL·d⁻¹ for 14 days. The pathological score for colonic mucosa was detected. Cytokines were detected by the cytokine chip. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the free triiodothyronine (FT₃), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and corticosterone (CORT) in plasma, and neurotensin (NT), substance P (SP), vasoactive intestinal peptide (VIP), and somatostatin (SST) in colon tissues. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased colon mass-length ratio and pathological score for colonic mucosa ($P<0.01$), infiltration of massive lymphocytes, disordered or absent intestinal villi, elevated levels of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1/2 α / β /3 (CINC-1/2 α / β /3), interleukin-1 α (IL-1 α), interferon-inducible protein-10 (IP-10) and other factors in colon tissues ($P<0.05$), dwindled CORT and GLP-1 levels in plasma ($P<0.05$), and increased SP content in colon tissues ($P<0.05$). Compared with the results in the model group, the mucosal injury in the colon of rats in each drug group was relieved. The levels of IL-1 α , IP-10, lipopolysaccharide-inducible CXC chemokine (LIX), and L-selectin of rats in the Lianlitang group and Sishenwan group were reduced ($P<0.05$), and the CINC-3 and IL-17 levels were diminished in the Baitouweng Tang group ($P<0.05$). The levels of CINC-1/3, IL-1 α , and IP-10 were reduced in the SASP group ($P<0.05$). The plasma FT₃ was up-regulated in the Lianlitang group, and the plasma GLP-1 levels were elevated in the three Chinese medicine groups ($P<0.05$). The VIP content in colon tissues of the Sishenwan group and Baitouweng Tang group was down-regulated ($P<0.05$), and the SST content in colon tissues of the SASP group was significantly up-regulated ($P<0.01$). **Conclusion:** The intervention of Lianlitang and Sishenwan on UC was significant, and the underlying mechanism of action might be related to inflammation inhibition and immune balance by regulating the cytokine network. The efficacy of Lianlitang was predominant, followed by Sishenwan and Baitouweng Tang.

[**Keywords**] Sishenwan; Baitouweng Tang; Lianlitang; ulcerative colitis (UC); cytokine chip; rats

溃疡性结肠炎(UC)作为一种常见多发的消化性溃疡疾病,临床迁延难愈、易反复发作,且发病率逐年上升,严重影响患者生活质量^[1]。UC的发病机制尚不明确,研究表明遗传、感染、免疫及环境等因素可诱发肠道黏膜损伤、免疫及神经内分泌功能失衡,可致肠道黏膜发生局部的溃疡性病变,为其发病的主要因素^[2-4]。中医学并无溃疡性结肠炎之病名,可将其归属于“肠癖”“大肠泄”“久痢”“血痢”“泄泻”等范畴,为本虚标实、寒热错杂之证,治当温阳、清热兼顾。因此推测UC可能为寒热错杂之证,又临床常用四神丸、白头翁汤和连理汤进行治疗。四神丸出自《金匱翼》,白头翁汤出自《伤寒论》,连理汤出自《证治要诀类方》,三方分别具温肾散寒、涩肠止泻,清热解毒、凉血止痢,温中祛寒、兼清郁热之功,其治法分属于温法、清法、温清并用法,研究表明三方对UC均有治疗作用,但其证候有异^[5-7]。故本实验以UC模型大鼠为研究对象,使用四神汤、白头翁汤及连理汤进行干预,以药示理反证UC的证型,观测不同治法对UC大鼠的结肠黏膜病理损

伤及细胞因子芯片差异的影响。

1 材料

1.1 动物 2月龄清洁级雄性SD大鼠90只,体重(230±20)g,中国食品药品检定研究院实验动物资源中心提供,动物合格证号SCXK(京)2009-0017。于中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心常规饲养,相对湿度45%~55%,室温22~25℃,自由饮水进食。实验动物处理通过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心实验动物福利伦理审查,且伦理委员会同意开展动物实验。

1.2 药物及试剂 中药饮片,人参、干姜、炒白术、茯苓、黄连、炙甘草、白头翁、黄柏、秦皮、补骨脂、吴茱萸、肉豆蔻、五味子,购自中国中医科学院门诊部,由中国中医科学院中医基础理论研究所刘振丽研究员鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》要求。柳氮磺吡啶(SASP)肠溶片(0.25g/片,上海信谊嘉华药业有限公司生产);2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma公司,货号P2297);细胞因子芯

片, γ 干扰素(IFN- γ)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国R&D公司,货号分别为ARY008, RIF00, RTA00);皮质酮(CORT), P物质(SP), 血管活性肠肽(VIP), 神经降压素(NT), 生长抑素(SST), 游离甲状腺激素(FT₃) ELISA试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司, 货号分别为E90540Ge, E90393Ra, E90380Ra, E91203Ra, E90592Ra, E90186Ge)。

1.3 仪器 3K15型高速低温离心机(美国Sigma公司); Elx800型酶标仪(美国BioTek公司); Pro200型电动匀浆器(美国PRO Scientific公司); AR2130型分析天平(美国Ohaus公司); Ettan DIGE型荧光扫描分析仪,(美国GE公司); N-800F型荧光显微镜(中国宁波永新光学股份有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与模型制备 将90只清洁级雄性SD大鼠适应性饲养3 d后随机分为正常组(12只)与造模组(78只), 造模成功后按随机数字表法分为模型、四神汤、白头翁汤、连理汤及阳性药(SASP)共5组, 每组12只。

参照文献[8]大鼠术前禁食不禁水24 h, 采用1%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉并备皮, 取仰卧位, 将直径2 mm的聚乙烯管经肛门插入肠道约8 cm处, 使用已制备的TNBS(0.3 mL)进行灌肠(TNBS配制比例, TNBS-无水乙醇2.4:1), 保持肛门高位30 s后抽出聚乙烯管, 静待30 min会有大量粪便排出, 之后依照上述灌肠方法经肛门注入TNBS(0.85 mL)进行灌肠, 保持肛门高位5 min以防灌肠液流出; 正常组大鼠灌肠等量生理盐水。造模2 d后, 观测造模大鼠腹泻指征(肛门有稀溏大便或有脓血)。分别于模型制备后当天及每隔1 d时随机麻醉处死3只大鼠进行病检, 并随机抽取1只正常组大鼠截取结肠与造模组对比观察病理变化, 共处死18只, 以确定模型成功, 并将成模大鼠纳入实验。

2.2 给药方法 依据《金匱翼》《伤寒论》《证治要诀类方》确定四神丸、白头翁汤及连理汤的药物组成及用量, 四神丸(补骨脂1 200 g, 吴茱萸300 g, 肉豆蔻600 g, 五味子600 g), 白头翁汤(白头翁600 g, 黄柏900 g, 黄连900 g, 秦皮900 g), 连理汤(人参450 g, 干姜450 g, 炒白术450 g, 茯苓450 g, 黄连300 g, 炙甘草150 g), 分别加入加8倍量水后煎煮30 min, 共2次, 120目滤网过滤后合并水浴浓缩, 70 °C减压真空干燥6 h, 其中四神丸出膏率为29.9%; 白头翁汤出膏率为29.9%; 连理汤出膏率为

26.6%。根据人与大鼠体表面积折算, 正常组和模型组大鼠给予2 mL·d⁻¹蒸馏水灌胃, 给药组均采取人与动物体表面积折算法计算, 折算系数0.018, 其中四神汤组、白头翁汤组和连理汤组大鼠分别给予1.76, 1.40, 2.13 g·kg⁻¹·d⁻¹对应的中药混悬液灌胃, SASP组大鼠给予0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ SASP溶液灌胃, 各组给药量为2 mL·d⁻¹, 干预14 d。

2.3 动物取材 末次给药后禁食不禁水24 h, 1%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉后采血, 离心取血浆层3 500 r·min⁻¹离心15 min(离心半径为16 cm, 下同), -20 °C冻存备用; 截取自结肠脾曲向下约2 cm处结肠, 量取长度、称质量, 并将其切分为2份, 一份加10倍量生理盐水匀浆, 3 500 r·min⁻¹离心15 min取上清, 冻存备用; 一份置于4%多聚甲醛固定液中, 待病检。

2.4 指标检测

2.4.1 观察各组大鼠一般生存状况 观察各组大鼠毛发光泽、便血等已按生存状态。

2.4.2 结肠黏膜损伤评分(CMDI) 取材并记录结肠组织粘连情况: 0分, 无粘连; 1分, 轻度粘连(结肠与其他组织剥离较易); 2分, 重度粘连。结肠组织溃疡形成及炎症的情况进行评分^[9]: 0分, 无; 1分, 局部充血, 无溃疡; 2分, 1处溃疡不伴充血或肠壁增厚; 3分, 1处溃疡伴炎症; 4分, ≥2处溃疡伴炎症; 5分, ≥2处溃疡和(或)炎症>1 cm; 6~8分, 溃疡和(或)炎症>2 cm, 病变范围每增加1 cm, 计分加1分。将肠组织粘连情况评分和溃疡形成及炎症评分相加, 即CMDI评分。结肠质量长度比=截取结肠质量/截取结肠长度。

2.4.3 各组大鼠结肠组织病理学损伤 将标本用4%多聚甲醛固定, 按规定操作后HE染色, 封片, 镜下观察。

2.4.4 各组大鼠结肠组织细胞因子芯片的变化 称取结肠组织, 加磷酸盐缓冲液(PBS)并充分匀浆, -70 °C速冻后再融化并1万 r·min⁻¹离心5 min, 取上清存于-20 °C冰箱; Pierce BCA法进行蛋白定量; 取细胞因子芯片加封闭液封闭1 h后滴加抗体4 °C振荡过夜, 清洗后加Streptavidin-HRP并室温孵育30 min, 显影。用TotalLab TL进行对结果图像进行分析, 得出各指标点的Pixel Density, 计算各指标相对表达量, 以各组间相对表达量上调>2倍、下调>50%作为显著差异标准的界限。

2.4.5 ELISA检测各组大鼠血浆FT₃, GLP-1, CORT及结肠组织NT, SP, VIP, SST含量 遵照ELISA试

剂盒说明书按步骤检测各组大鼠血浆中FT₃、GLP-1、CORT和结肠组织中NT、SP、VIP、SST的含量,使用酶标仪测定450 nm波长时各孔吸光度A,并绘制标准曲线,计算样品含量。

2.5 统计学处理 采用SPSS 24.0软件统计进行分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数差异的比较用方差分析,方差不齐用单因素方差分析,组间比较采用LSD法比较,方差不齐用非参数统计中的多个独立样本Kruskal-Wallis H检验,组间比较采用Mann-Whitney U法比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对UC大鼠一般生存状况的影响 正常组大鼠始终表现为反应灵敏,皮毛浓密有光泽,活动正常,粪便呈棕褐色颗粒状,肛周无稀溏大便或脓血便现象,但其中1只大鼠因操作不当意外死亡。造模后大鼠第2天出现皮毛干枯缺少光泽及倦卧嗜睡等现象,第3天出现大便稀溏带血等现象,第5天出现明显脓血便现象,第7天出现明显少食懒动、消瘦、对外界反应迟钝及毛发枯槁倒立等表现,且模型组大鼠死亡1只。经药物干预后第6天,连理汤组、四神汤组、白头翁汤组及SASP组大鼠各症状均逐渐缓解,表现为脓血便逐渐消失、大便形状逐步恢复正常、皮毛逐渐光泽、反应逐渐灵敏,以连理汤组和SASP组大鼠表现较为明显,四神汤组白头翁汤组次之。

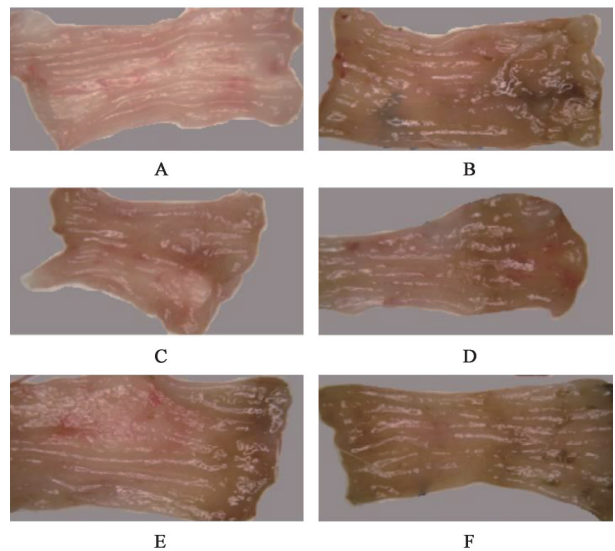
3.2 对UC大鼠结肠组织损伤的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠质量长度比及CMDI评分显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),与模型组比较,各给药组大鼠结肠结肠黏膜损伤逐渐减轻,其中质量长度比显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),结肠黏膜损伤评分虽有降低趋势,差异无统计学意义。见表1,图1。

表1 四神丸、白头翁汤、连理汤对UC大鼠结肠组织损伤的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on colon tissue injury in UC rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	质量长度比 /mg·mm ⁻¹	CMDI /分
正常	10		6.70±1.00	0.10±0.32
模型	11		27.85±21.83 ¹⁾	6.64±3.56 ¹⁾
连理汤	12	2.13	14.18±3.57 ²⁾	4.62±3.07
四神汤	12	1.76	14.77±6.79 ²⁾	4.25±3.31
白头翁汤	12	1.40	14.98±3.40 ²⁾	4.42±2.87
SASP	12	0.40	14.25±5.19 ²⁾	4.54±3.18

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ 。



A. 正常组;B. 模型组;C. 连理汤组;D. 四神汤组;E. 白头翁汤组;F. SASP组(图2同)

图1 四神丸、白头翁汤、连理汤对UC大鼠结肠组织损伤的影响

Fig. 1 Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on colon tissue injury in UC rats

3.3 对UC大鼠结肠病理变化的影响 正常大鼠结肠组织镜下结构完整,有清晰的肠绒毛,隐窝较深,有少量淋巴细胞浸润,无溃疡;与正常组比较,模型大鼠结肠大部分肠黏膜完整性破坏,出现大量淋巴细胞浸润,肠绒毛紊乱,甚至消失,出现瘢痕组织和未愈合溃疡,结肠隐窝严重缺失;与模型组比较,各给药组大鼠结肠组织均有明显改善,其中连理汤、四神汤及SASP大鼠结肠组织肠绒毛结构清晰,淋巴细胞浸润减少,隐窝存在,但明显变浅,肠壁增厚;白头翁汤大鼠结肠组织有大量淋巴细胞浸润,肠绒毛模糊,隐窝明显变浅,有少量溃疡,肠壁增厚。见表2,图2。

3.4 对UC大鼠结肠组织细胞因子的影响 与正常组比较,模型大鼠结肠组织CINC-1/2 α / β /3, IL-1 α /1 β , IL-1ra, IL-2/3/17, IP-10, LIX, L-selectin, MIG, MIP-1 α ,调节活化正常T细胞表达和分泌的趋化因子(RANTES)及TNF- α 含量显著升高,MIP-3 α 含量显著降低,差异具有统计学意义;与模型组比较,连理汤及四神汤组大鼠IL-1 α /3/17, IP-10, LIX, L-selectin, MIG及MIP-1 α ,四神汤组大鼠CINC-3, RANTES及TNF- α 含量显著降低,差异具有统计学意义,连理汤及四神汤组大鼠MIP-3 α 含量有降低趋势,差异无统计学意义;白头翁汤组大鼠CINC-3, IL-17, IP-10, LIX及TNF- α 含量显著降低,MIP-3 α 含量显著升高,差异具有统计学意义;SASP组大鼠CINC-1/3, IL-1 α /1 β /2/3/17, IP-10, LIX, L-selectin,

表2 四神丸、白头翁汤、连理汤对UC大鼠结肠组织病理损伤的影响

Table 2 Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on pathological injury of colon tissue in UC rats

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	淋巴细胞浸润	肠壁增厚	血管密度增加	溃疡形成	隐窝
正常	10		很少	无	无	无	正常
模型	11		大量(>75%)	显著增厚糜烂	增加或瘢痕	大面积	消失或扭曲
连理汤	12	2.13	少量(<25%)	明显增厚	增加	无	基底不完整
四神汤	12	1.76	少量(<25%)	明显增厚	增加	无	基底不完整
白头翁汤	12	1.40	中等(50%~75%)	明显增厚	增加	小面积	基底不完整上部扭曲
SASP	12	0.40	少量(<25%)	明显增厚	增加	无	基底不完整

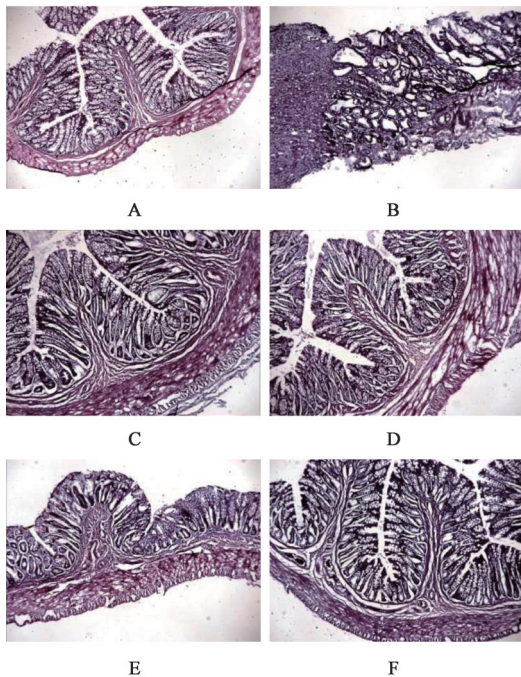


图2 四神丸、白头翁汤、连理汤对UC大鼠结肠组织病理学的影响(HE, ×100)

Fig. 2 Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on colon histopathology of UC rats (HE, ×100)

MIG, MIP-1 α , RANTES及TNF- α 含量显著降低, MIP-3 α 含量显著升高,差异具有统计学意义。结果见表3。

3.5 对UC大鼠胃肠激素的影响

3.5.1 对UC大鼠血浆CORT, FT₃, GLP-1含量的影响 与正常组比较,模型大鼠血浆CORT及GLP-1含量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), FT₃含量虽有降低趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,各给药组大鼠血浆CORT含量有升高趋势,差异无统计学意义;连理汤组大鼠血浆FT₃含量明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),四神汤、白头翁汤及SASP组大鼠血浆FT₃含量有升高趋势,差异无统计学意义;连理汤、四神汤及白头翁汤组大鼠血浆GLP-1含量明显升高,差异具有统

计学意义($P<0.05$), SASP大鼠血浆GLP-1含量有升高趋势,差异无统计学意义。见表4。

3.5.2 对UC大鼠结肠组织NT, SP, VIP, SST含量的影响 与正常组比较,模型大鼠结肠组织SP含量明显升高, SST含量显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), VIP及NT含量有升高趋势,差异无统计学意义;与模型组比较,四神汤及白头翁汤组大鼠结肠组织VIP含量显著降低, SASP组大鼠结肠组织SST含量显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),各给药组大鼠结肠组织SP及NT含量有升高趋势, SASP组大鼠结肠组织VIP含量有降低趋势,四神汤及白头翁汤大鼠结肠组织SST含量有升高趋势,差异无统计学意义。见表5。

4 讨论

根据UC临床症状特点,中医学将其归属于“肠癖”“大肠泄”“久痢”“血痢”“泄泻”等病证范畴。据2010年中华中医药学会脾胃病分会《溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见》并结合临床报道分析,认为其核心病机是本虚标实、寒热错杂,治当温中祛寒,兼清郁热。

UC虽致病诱因众多,但其发病机制与炎症反应及免疫失衡密切相关,研究表明促炎因子如IL-1/2/6/8, TNF- α 等与抗炎因子IL-4/5/10/13等可同时或相继、直接或间接作用于靶细胞^[10],细胞因子参与免疫反应和炎症过程,其异常分泌促使UC发生及发展^[11]。肠黏膜受损时可产生炎症介质如前列腺素(PG),白细胞三烯(LT),组胺及5-羟色胺(5-HT)等,可与细胞因子相互影响并形成复杂网络,网络调控的失衡可能是UC发病的关键因素。T细胞亚群参与炎症反应的同时也是免疫反应的核心环节^[12],研究表明CD4⁺/CD8⁺比例升高,可致炎症反应与免疫调节异常^[13-14]。天然免疫细胞NOD样受体可激活核转录因子- κ B(NF- κ B)通路^[15],进而释放大细胞因子及趋化因子,促进T淋巴细胞迁移和聚

表3 四神丸、白头翁汤、连理汤对UC大鼠结肠组织细胞因子表达水平的影响

Table 3 Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on expression of cytokines in colon tissue of UC rats

组别	CINC-1	CINC-2 α / β	CINC-3	CNTF	Fractalkine	GM-CSF	sICAM-1	IFN- γ	IL-1 α	IL-1 β
正常	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
模型	8.54	7.70	8.01	0.71	0.95	1.20	1.48	0.90	7.40	2.25
连理汤	6.05	5.22	4.26	1.64	1.09	1.64	1.23	0.93	2.45	1.61
四神汤	6.34	6.92	1.29	1.03	1.19	1.14	1.06	1.13	3.26	1.90
白头翁汤	7.38	7.75	3.53	1.43	2.06	1.66	1.48	1.75	4.44	2.79
SASP	4.13	4.96	3.85	1.28	1.45	1.37	1.42	1.26	2.36	2.44
组别	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-10	IL-13	IL-17	IP-10	LIX
正常	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
模型	6.94	2.94	4.76	1.24	1.23	1.58	1.99	4.30	16.70	23.39
连理汤	5.11	2.72	1.62	0.50	0.96	1.00	1.72	1.08	2.06	4.55
四神汤	6.26	3.61	0.65	0.84	2.65	0.99	2.53	1.68	1.30	8.89
白头翁汤	9.45	2.08	3.28	1.09	3.09	1.87	2.87	1.88	4.45	10.20
SASP	5.72	3.03	2.38	1.37	0.84	1.62	1.33	2.04	4.87	3.96
组别	L-selectin	MIG	MIP-1 α	MIP-3 α	RANTES	Thymus Chemokine	TIMP-1	TNF- α	VEGF	
正常	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
模型	3.60	7.78	6.62	0.47	5.92	1.42	1.68	28.72	1.43	
连理汤	1.56	2.16	2.62	0.82	4.81	1.07	1.59	18.65	2.12	
四神汤	1.75	0.93	2.29	0.85	2.43	1.45	1.53	2.78	1.72	
白头翁汤	2.34	8.69	8.68	0.99	6.00	1.33	1.48	8.87	2.31	
SASP	2.42	2.73	3.28	0.44	3.84	1.11	1.62	8.84	2.27	

表4 四神丸、白头翁汤、连理汤对UC大鼠血浆CORT, FT₃, GLP-1含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on contents of CORT, FT₃ and GLP-1 in the plasma of UC rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/g·kg ⁻¹	CORT/ μ g·L ⁻¹	FT ₃ /ng·L ⁻¹	GLP-1/ μ g·L ⁻¹
正常	10		494.18 \pm 229.89	26.77 \pm 7.82	1.15 \pm 0.25
模型	11		264.46 \pm 119.96 ²⁾	22.11 \pm 8.04	0.91 \pm 0.25 ¹⁾
连理汤	12	2.13	369.17 \pm 189.45	29.10 \pm 8.04 ³⁾	1.18 \pm 0.24 ³⁾
四神汤	12	1.76	372.71 \pm 234.61	26.63 \pm 5.53	1.19 \pm 0.23 ³⁾
白头翁汤	12	1.40	264.64 \pm 104.57	23.59 \pm 5.74	1.19 \pm 0.23 ³⁾
SASP	12	0.40	274.77 \pm 121.54	20.87 \pm 7.81	1.08 \pm 0.24

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$ 。

表5 四神丸、白头翁汤、连理汤对UC大鼠结肠组织NT, SP, VIP, SST含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of Sishenwan, Baitouweng Tang, and Lianlitang on NT, SP, VIP and SST contents in colon tissue of UC rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/g·kg ⁻¹	SP/ng·L ⁻¹	VIP/ng·L ⁻¹	SST/ng·L ⁻¹	NT/nmol·g ⁻¹
正常	10		13.21 \pm 3.45	161.05 \pm 14.07	5.88 \pm 0.99	72.92 \pm 29.36
模型	11		21.58 \pm 9.24 ¹⁾	164.72 \pm 34.51	4.28 \pm 0.78 ²⁾	100.29 \pm 34.52
连理汤	12	2.13	21.93 \pm 7.99	137.68 \pm 26.20	4.16 \pm 0.84	101.94 \pm 39.06
四神汤	12	1.76	17.83 \pm 7.71	120.79 \pm 43.09 ⁴⁾	4.44 \pm 0.48	82.45 \pm 33.97
白头翁汤	12	1.40	22.51 \pm 11.68	110.66 \pm 37.19 ⁴⁾	4.53 \pm 0.82	92.59 \pm 59.25
SASP	12	0.40	19.75 \pm 12.55	152.73 \pm 32.19	5.14 \pm 1.58 ³⁾	92.87 \pm 21.80

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

集,致使T淋巴细胞分泌更多的细胞因子及趋化因子,最终形成恶性循环导致炎症及免疫反应失控,造成肠道黏膜的损伤和破坏^[16],最终形成UC等炎症性肠病。本研究UC大鼠结肠中CINC-1/2 α / β /3, LIX, MIG, IP-10, MIP-1 α 及RANTES含量显著升高,UC大鼠出现自然免疫过度反应,致使结肠黏膜受到损伤和破坏。IP-10作为活化淋巴细胞的趋化因子,与炎症反应关系密切^[17],温清三方对LIX及IP-10的下调作用,提示温清三方可通过对淋巴细胞的调节进而抑制UC获得性免疫的过度反应以减弱结肠黏膜的损伤和破坏。连理汤、四神丸能显著下调MIP-1 α , MIG, L-selectin的表达,表明连理汤、四神丸对T淋巴细胞的趋化作用调节较白头翁强,四神丸对RANTES, CINC-3的下调作用明显,说明四神丸对结肠炎症中非特异性免疫也有较好的调节作用。故温清三方对UC趋化因子的调控以四神丸较优、连理汤次之、白头翁再次之。

TNF- α 主要由单核细胞及T细胞等产生,可促进肠上皮细胞的分泌及上调T细胞数目,刺激内皮细胞分泌花生四烯酸代谢物、细胞因子(CK)和蛋白酶,还能引起细胞坏死、间质中蛋白质破坏和水肿的发生,从而促进胃肠细胞的组织损害,此外TNF- α 可协同IFN- γ 改变肠上皮细胞的形态结构和屏障特性,导致黏膜通透性增加,促进UC的发生^[18]。本实验中模型大鼠IL-1 α /1 β /1ra, TNF- α 均显著增高,提示TNBS诱导了如单核细胞、巨噬细胞等天然免疫细胞的激活,促进T淋巴细胞分化,分泌IL-1 α /1 β , TNF- α ,使得中性粒细胞向炎症部位聚集,进入肠道病变部位,从而引起一系列的肠道病变,同时也激活了平衡机制IL-1ra的分泌促进了炎症反应,致使UC发病。连理汤和四神丸对IL-1 α , TNF- α 的升高有显著调节作用,提示连理汤和四神丸可通过抑制结肠炎细胞因子的分泌进而降低炎症反应;IL-2主要由T淋巴细胞在IL-1诱导下分泌,与T细胞表面的IL-2受体结合后,引起T细胞活化、增殖,促进其杀伤能力,以增强NK细胞活性,促进B细胞分泌等细胞免疫反应。IL-3主要是由活化的T细胞分泌,可特异地表达于T淋巴细胞, NK细胞,有抗肿瘤、免疫调解等作用。IL-17主要由Th17细胞分泌,可通过诱导促炎细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶的表达引起细胞浸润和组织破坏。本实验模型大鼠结肠IL-2/3显著升高,提示免疫应答及对异物损伤的灵敏性增强,炎症反应过度,连理汤及四神丸对IL-3有显著下调作用,说明二者可能通过抑制炎

症反应的强度保护肠黏膜;温清三方IL-17含量显著下降,说明三方均能调节T淋巴细胞介导的免疫反应,减轻炎症反应。

血浆CORT与FT₃均可间接影响胃肠的炎症反应, GLP-1是由肠道神经内分泌细胞L细胞分泌的一种肽类激素,具有抑制胃排空的作用,可通过迷走神经上的受体引起迷走神经兴奋,导致食管下段括约肌松弛,同时产生饱感及腹胀等症状^[19]。模型大鼠血浆GLP-1水平显著下降,温三清方均能显著提高结肠炎大鼠的血浆GLP-1水平,说明温清三方均能改善腹胀等症状。P物质属于速激肽家族,可激活淋巴细胞来影响免疫细胞释放组织胺, IL-1及TNF- α 等介质^[20],引起炎症和疼痛。本实验模型大鼠结肠SP含量显著升高,提示模型大鼠处于UC的活动期,四神丸有下调结肠SP的趋势,但各方不能有效抑制SP的产生。VIP是一种小分子多肽,为免疫调节剂及炎症介质。研究表明VIP高表达能使乙状结肠平滑肌松弛、刺激肠道水分及电解质的分泌^[21],致大便稀溏及次数增多,与本实验结果类似。故推测各治疗组起到了类VIP的调节作用,抑制了结肠本身VIP的分泌,从而起到了稳定肠道运动、抑制炎症的作用。SST是一种强烈的胃肠激素抑制剂,对免疫应答和炎症反应的具有调节作用^[22-23]; NT是一种脑肠肽,能抑制胃液和胃蛋白酶的分泌,增强肠道运动收缩力,对肠黏膜有营养和保护作用,能增强其机械屏障^[24]。本实验中模型大鼠结肠SST含量显著降低,提示对胃肠运动和促炎因子的抑制不足,NT含量有上升趋势且各治疗组间无明显变化,说明TNBS诱导结肠炎并未引起NT明显变化。

综上所述,连理汤、四神丸对UC大鼠的胃肠功能具有促进作用,可通过对细胞因子网络的影响实现对炎症反应的抑制及免疫平衡的调控,同时连理汤、四神丸对UC良好的干预作用反证了TNBS诱导溃疡性结肠炎是以寒热错杂、以寒为主的证型,可为临床辨证论治溃疡性结肠炎提供理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 孙平良. 基于代谢组学的溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态变化及安肠汤干预机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [2] MA X, CHEN Y, HUANG F, et al. Food intolerance prevalence in active ulcerative colitis in southwest China[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2016, 25(3): 529-

- 533.
- [3] 孙健,高文艳,林一帆. 溃疡性结肠炎病因和发病机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(4):94-97.
- [4] 弓艳霞,唐艳萍,牛薇,等. 溃疡性结肠炎发病机制及治疗研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2018,24(4):512-516.
- [5] 魏永辉,陈子豪,曹丽颖,等. 白头翁汤加减对溃疡性结肠炎的疗效及部分机制研究[J]. 世界中医药,2020,15(24):3831-3835.
- [6] 王燕,柳荣,朱向东. 四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织PI3K/Akt/mTOR信号通路的免疫组化影响[J]. 中国实验动物学报,2021,29(1):42-48.
- [7] 潘婧,窦欣,杜梦斐. 加味连理汤治疗溃疡性结肠炎的临床实验研究[J]. 北方药学,2017,14(9):73.
- [8] 张冰冰,齐越,贾冬,等. 2,4,6-三硝基苯磺酸诱导溃疡性结肠炎大鼠模型的建立及评价[J]. 中华中医药学刊,2015,33(8):1834-1836,2050.
- [9] 曾于恒,杨芳,何永恒. 2,4,6-三硝基苯磺酸与不同浓度乙醇诱导大鼠溃疡性结肠炎模型的建立及其稳定性评价[J]. 中南药学,2017,15(12):1665-1669.
- [10] MUDTER J, NEURATH M F. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13(8):1016-1023.
- [11] 张娇娇,张帆,余星星,等. 溃疡性结肠炎发病机制及中西医治疗研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2021,23(1):70-74.
- [12] KOTZE P G, STRONG S A, LIGHTNER A L. Advances in inflammatory bowel diseases 2020 virtual: key take-home points[J]. *Dis Colon Rectum*, 2021,2(13):1045-1062.
- [13] 袁柏思,金鑫鑫,路又可,等. 克罗恩病患者外周血CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞变化与炎症标记物的关系[J]. 胃肠病学,2015,20(3):143-146.
- [14] 吴飞虎,宋任洁,蔡传羽,等. 疏风解毒胶囊对急性咽炎大鼠血清T细胞亚群CD3⁺、CD4⁺/CD8⁺的影响[J]. 北京中医药,2020,39(7):689-692.
- [15] MALOY K J, POWRIE F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease [J]. *Nature*,2011,474(7351):298-306.
- [16] SHAPIRO J M, SUBEDI S, LELEIKO N S. Inflammatory bowel disease[J]. *Pediatr Rev*, 2016, 37(8):337-347.
- [17] 刘娜,张长庚,李伟,等. 趋化因子 γ 干扰素诱导蛋白-10和巨噬细胞炎性蛋白-3a在肝癌患者外周血中的表达及诊断价值[J]. 实用医学杂志,2019,35(16):2641-2644.
- [18] 陈春妮,江悦,高何,狄世豪,等. 炎性细胞因子在炎症性肠病发病机制中的作用[J]. 中华病理学杂志,2019,48(2):160-163.
- [19] 杨桂芳,胡克振. 胰高血糖素样肽-1的生理功能及相关药物评价[J]. 药物流行病学杂志,2008,17(4):224-227.
- [20] PATEL M, VALAIYADUPPU SUBAS S, GHANI M R, et al. Role of substance P in the pathophysiology of inflammatory bowel disease and its correlation with the degree of inflammation [J]. *Cureus*, 2020, 12(10): e11027.
- [21] 叶贝,黄永坤. P-物质、血管活性肠肽、胃泌素和5-羟色胺与胃肠功能的研究进展[J]. 国际儿科学杂志,2017,44(4):249-252.
- [22] 米红. 神经肽 Spexin在大肠湿热型溃疡性结肠炎中的机制研究[D]. 广州:广州中医药大学,2016
- [23] 吕飞,田书芳,卢光新. 溃疡性结肠炎患者中神经肽Y的检测意义分析[J]. 中国实验诊断学,2017,21(6):967-970.
- [24] 肖政华,谭芊任,崔峻松. 胃康3号对功能性消化不良小鼠胃窦、十二指肠及脑组织NT、CGRP受体表达的影响[J]. 山东医药,2019,59(10):46-49.

[责任编辑 周冰冰]