

白头翁汤加减联合双歧杆菌制剂对大鼠溃疡性结肠炎的影响

赵欣¹, 恽海峰², 向桂玲³, 韩丹¹, 金逸纯¹, 孙宏文^{2*}, 姚瑶⁴

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046; 2. 苏州市中医医院, 江苏苏州 215003;
3. 青岛大学附属医院, 山东青岛 266003; 4. 武汉大学人民医院, 武汉 430061)

[摘要] **目的:**探讨白头翁汤加减联合双歧杆菌制剂治疗溃疡性结肠炎的效果及其作用机制研究。**方法:**SPF级SD大鼠60只,随机抽取8只大鼠作为正常组,剩余52只造模。采用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇灌肠法复制溃疡性结肠炎模型,第3天随机抽取2只解剖,观察造模是否成功。剩余的50只大鼠随机分为5组,每组10只,分别为模型组,丽珠肠乐(双歧杆菌制剂)组(丽珠肠乐组),丽珠肠乐+白头翁汤加减高、中、低浓度组(联合高、中、低剂量组),定时给药持续14 d,评估大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)。取材后行苏木素-伊红(HE)染色;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清D-乳酸(D-lactic acidosis, D-LA),二胺氧化酶(double amine oxidase, DAO)水平及结肠细胞因子白细胞介素-8(IL-8), IL-13水平;实时荧光定量-聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测双歧杆菌及IL-1 β mRNA的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠体质量明显降低,DAI和HE染色评分均明显升高,血清D-LA, DAO及结肠组织IL-8水平明显升高,IL-13水平明显降低,双歧杆菌mRNA明显降低及IL-1 β mRNA明显升高($P < 0.05$);联合组高剂量组死亡率低于丽珠肠乐组,各给药组大鼠体质量均高于模型组($P < 0.05$);联合组高剂量组死亡率低丽珠肠乐组,且体质量高于丽珠肠乐组($P < 0.05$);联合组高剂量组DAI低于丽珠肠乐组($P < 0.05$);联合组高剂量组HE评分低于丽珠肠乐组($P < 0.05$);与丽珠肠乐组比较,联合组高剂量组D-LA, DAO和IL-8降低,IL-13升高($P < 0.05$);各用药组大鼠结肠组织中双歧杆菌mRNA相对含量均有增加($P < 0.05$);联合组高剂量组双歧杆菌mRNA相对含量高于丽珠肠乐组($P < 0.05$);联合组高剂量组IL-1 β 的相对表达量低于丽珠肠乐组($P < 0.05$)。**结论:**高剂量白头翁汤加减联合双歧杆菌制剂可能通过促进溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜修复,加强肠道双歧杆菌定植,降低D-LA, DAO和IL-8,升高IL-13水平,下调IL-1 β mRNA表达发挥协同治疗作用。

[关键词] 白头翁汤加减; 双歧杆菌; 溃疡性结肠炎; 白细胞介素(IL)-8; IL-13; D-乳酸; 二胺氧化酶; IL-1 β

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0110-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181037

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1023.012.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 10:54

Effect and Mechanism of Modified Baitouweng Tang Combined with Bifidobacterium Capsule on Rat Model of Ulcerative Colitis

ZHAO Xin¹, YUN Hai-feng², XIANG Gui-ling³, HAN Dan¹, JIN Yi-chun¹, SUN Hong-wen^{2*}, YAO Yao⁴

(1. First Clinical of Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Department of Gastroenterology, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215003, China;

3. Department of Respiratory Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China; 4. Wuhan University People's Hospital, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of modified Baitouweng Tang combined with bifidobacterium capsule in the treatment of ulcerative colitis. **Method:** Eight of a total of 60 SD rats were

[收稿日期] 20171229(007)

[基金项目] 国家中医药管理局吴门医派杂病流派传承工作室项目([2012]228);苏州市科技局民生科技-医疗卫生应用基础研究[第五项]项目(SYSD2016192)

[第一作者] 赵欣,在读硕士,从事脾胃学研究, Tel:0512-67872829, E-mail:1617345493@qq.com

[通信作者] *孙宏文, 硕士, 主任中医师, 从事脾胃病的中西医结合诊治研究, Tel:0512-67872829, E-mail:shw8101@163.com

randomly selected as normal group (group A). We replicated the ulcerative colitis model with the remaining 52 rats by TNBS/ethanol enema. Rats were dissected at random at the 3rd days, so as to observe if the model was successfully established. The remaining 50 rats were randomly divided into 5 groups: modern group (group B), bifidobigen (bifidobacterium capsule) group (group C), and high, medium and low-concentration bifidobigen + modified Baitouweng Tang of group (group D, E, F), with 10 rats in each group. After 2 weeks of treatment, disease activity index (DAI) in rats was evaluated. HE staining was performed after the materials were collected. ELISA was used to detect serum *D*-lactate (*D*-LA), two amine oxidase (DAO) levels and colon tissue cytokine IL-8 and IL-13 levels. Real-time PCR method was used to detect the mRNA expressions of Bifidobacterium and IL-1 β . **Result:** The mortality of group D was lower than that in group C. The weight of each drug group was higher than that of group B ($P < 0.05$); group D had a lower mortality than group C, and the weight was higher than that of group C ($P < 0.05$); DAI in group D was lower than that of group C ($P < 0.05$). HE scale in D group was lower than that of group C ($P < 0.05$); compared with group C, group D had lower *D*-LA, DAO and IL-8 levels and a higher IL-13 level ($P < 0.05$). Bifidobacterium mRNA relative content in group D was higher than that of group C ($P < 0.05$); the expression of IL-1 β in group D was lower than that of group C ($P < 0.05$). **Conclusion:** High concentration of modified Baitouweng Tang combined with bifidobacterium capsule may play a synergistic role in promoting colonic mucosal repair, strengthening bifidobacterium colonization in intestinal tract, reducing *D*-LA, DAO and IL-8, increasing IL-13 level, and down-regulating the mRNA expression of IL-1 β in ulcerative colitis rats.

[Key words] modified Baitouweng Tang; bifidobacteria; ulcerative colitis; interleukin-8 (IL-8); IL-13; *D*-lactate; two amine oxidase (DAO); IL-1 β

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种非特异性炎症性疾病, 特征性表现为结直肠糜烂、溃疡及黏膜炎症^[1]。中医将其归属于“肠澼”、“痢疾”、“久痢”等疾病范畴, 病情复杂, 迁延难愈。张仲景的《伤寒杂病论》将泻痢并论, 统称为“下利”, 故将 UC 包括在“下利”中。其中“下利已差, 至其年、月、日、时复发者, 以病不尽故也, 当下之”, 突出本病发作与休止交替出现的特点, 后世称之为“休息痢”^[2]。白头翁汤作为清热祛湿法的代表方剂最早见于《伤寒论》, 根据国家中医药管理局关于久痢 (溃疡性结肠炎) 临床路径诊疗方案及其相关评价研究^[3], 并结合长期临床经验和有关文献^[4], 制定白头翁汤加减, 白头翁汤加减是现代吴门医派在白头翁汤基础上加减组成的经验方, 而白头翁汤经现代大量临床及动物实验研究, 已证明其对溃疡性结肠炎的确有良好疗效^[5]。

目前西医治疗主要以非甾体类抗炎药、糖皮质激素、免疫抑制剂为主, 但副作用较大, 且效果不甚理想。大量研究表明, 益生菌能改善肠道通透性和黏膜免疫功能, 能临床缓解 UC 的发展和恶化, 益生菌治疗 UC 的疗效优于安慰剂^[6-7]。此外, 在 UC 患者粪便中检测到的双歧杆菌数量低于健康人群^[8]。直接补充双歧杆菌可以调节肠道微生物群, 对抗炎

症, 改善症状, 减轻肠道黏膜损害, 缓解 UC 的恶化, 但对急性 UC 的疗效还不显著^[9]。为了更好的发挥白头翁汤加减与双歧杆菌治疗 UC 的潜力, 本研究构建 UC 大鼠模型, 探讨白头翁汤加减联合双歧杆菌微生态制剂对 UC 大鼠模型的治疗作用及机制, 为 UC 提供一种有效的临床治疗方式。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量 200 ~ 220 g, 由昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司提供, 合格证号 SCXK (苏) 2013-0003, 本动物实验经南京中医药大学动物伦理委员会批准进行, 实验动物符合伦理委员会规定适应实验室环境 1 周。

1.2 药物及试剂 白头翁汤加减由白头翁 30 g, 秦皮 30 g, 黄柏 10 g, 黄连 10 g, 仙鹤草 30 g, 紫草 30 g, 三七 6 g, 白及 20 g 组成, 所有中药饮片均由苏州市中医院中药房提供, 由苏州市中医医院主任药师鉴定均为正品, 符合 2015 年版《中国药典》规范, 苏州市中医院制剂部煎制, 先将药物浸泡 30 min, 蒸馏水煎煮提取 2 次, 过滤后合并提取液, 于灭菌旋转蒸发器中 (真空压力, 80 °C) 浓缩为生药质量浓度为 4 g·mL⁻¹ 的中药原液, 冷却后装入灭菌玻璃药瓶, 置于 4 °C 冰箱保存备用; 双歧杆菌活菌胶囊 (丽珠

肠乐, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号 20161216, 每粒 0.35 g, 含青春型双歧杆菌活菌 0.5×10^8 个; 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (TNBS, 批号 2508-19-2)^[10-11]。D-乳酸 (D-LA), 二胺氧化酶 (DAO), 白细胞介素 (IL)-8, IL-3 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 RAB0411-1KT, RAB0028-1KT, RAB0317-1KT, RAB0258); SYBR GREEN I Real Time Mix (日本 TaKaRa 公司, 批号 V201607Da); 10% 甲醛 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G2160)。

1.3 仪器 FACS Calibu 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司), Nanodrop 2000C 型电泳仪及转膜仪 (美国 Thermo 公司), Eppendorf 5331 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (德国 Eppendorf 公司), CKX41 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 模型及分组 SPF 级 SD 大鼠 60 只。随机抽取 8 只大鼠作为正常组, 不予造模; 参照文献 [12-13] 对剩余 52 只大鼠进行造模: 采用 TNBS/乙醇灌肠液 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TNBS + 50% 的乙醇溶液), $0.25 \text{ mL}/\text{只}$ 灌肠; 大鼠禁食 24 h 后, 10% 水合氯醛腹腔麻醉 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 大鼠固定, 用涂有甘油的灌胃针由大鼠肛门缓缓插入, 深度到达 4~5 cm 时, 将 1 mL 注射器针管吸取灌肠液与灌胃针相连, 缓慢注射药物, 同时向肛门内缓缓推进灌胃针, 推进 8 cm 左右深度时将药物完全注射, 将大鼠头朝下, 使固定大鼠的解剖台面倾斜 (约呈 45 度) 放置 1 min 左右, 确保药物在大鼠结肠内弥散, 诱导 UC 形成; 正常组用蒸馏水 0.25 mL 灌肠; 让大鼠保持平躺, 苏醒后送回动物房继续饲养, 每日观察进食量、饮水量、毛发光泽度、大便性状以及活动情况; 当大鼠产生典型的 UC 活动期症状时, 随机抽取 2 只解剖, 结肠病理显示充血、水肿、炎细胞浸润、隐窝脓肿、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化, 造模成功; 将剩余 50 只大鼠随机分为 5 组 (10 只/组), 模型组、丽珠肠乐组、联合 (丽珠肠乐 + 白头翁汤加减) 高、中、低浓度组 (联合高、中、低剂量组)。

2.2 给药 造模成功后第 4 天开始用药, 蒸馏水稀释白头翁汤加减, 加热至 $35 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$ 进行灌胃; 丽珠肠乐组采用丽珠肠乐 (1.0×10^8 个活菌/mL) 灌胃治疗; 联合高剂量组采用 ($40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 白头翁汤加减 + $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 丽珠肠乐), 联合中剂量组

($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 白头翁汤加减 + $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 丽珠肠乐), 联合低剂量组 ($0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白头翁汤加减 + $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 丽珠肠乐); 正常组与模型组采用蒸馏水灌胃; 每只大鼠按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行灌胃, 每日 1 次, 定时给药持续 14 d。

2.3 取材 禁食 24 h, 无菌条件下采集大鼠新鲜粪便 (约 0.5 g), 抽提细菌 DNA 于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存; 断颈法处死大鼠, 迅速剖腹, 腹主动脉取血 2 mL, 离心后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存; 肛门 2 cm 处向上取 6 cm 结肠, 纵形切开, 蒸馏水冲洗干净, 每个标本上取 2 cm 结肠, 迅速投入 10% 甲醛固定, 24 h 后进行石蜡包埋, 余下组织 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存用于后续实验。

2.4 检测指标

2.4.1 大鼠一般状态观察 大鼠精神状态、进食、活动、皮毛、体质量、体温、大便、死亡等情况, 按表 1 评估大鼠疾病活动指数 (DAI)^[14]。

表 1 疾病活动评分系统

Table 1 Disease activity index scoring system

症状	分值			
	0	1	2	3
比平时增多的排便次数	0	1~2	3~4	>5
大便带血情况	无	偶尔	经常	均有
结肠镜下黏膜炎症	无	轻度	中度	重度
体质量减轻率	-	1%~5%	6%~10%	11%~15%

注: DAI 是用于评估肠道炎症程度的临床标准。

2.4.2 HE 染色观察病理组织情况 取大鼠结肠组织 0.5 cm , 投入 10% 甲醛进行固定, 分别用 100%, 95%, 80%, 75% 的乙醇溶液脱水 5 min, 二甲苯透明, 将组织放入融化的石蜡冷却凝固, 切 $6 \mu\text{m}$ 厚, 二甲苯、乙醇溶液脱蜡, 放入蒸馏水, 滴加苏木素染液染色 10 min, 浸入 1% 盐酸乙醇液中 3 s, 蒸馏水冲洗, 加入伊红染液复染 4 min, 再进行乙醇溶液脱水、二甲苯透明处理, 滴加中性树脂封片, 显微镜下观察组织结构、炎症和溃疡损伤程度, 进行病理学评分^[15], 评估标准见表 2。

2.4.3 ELISA 检测血清 D-LA 及 DAO 水平 将蒸馏水与结肠组织混合 (9:1), 制成匀浆, 离心 12 min ($5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 取上清, ELISA 检测细胞因子 IL-8, IL-13 水平, 均按照试剂盒说明书进行操作。

2.4.4 采用 Real-time PCR 检测粪便中双歧杆菌含量及结肠组织中 IL-1 β mRNA 的表达

2.4.4.1 粪便中双歧杆菌 mRNA 的表达 双歧杆

表 2 HE 评分标准

Table 2 Histological colitis scoring system

评估指标	病变特征	分数
炎症	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
病变程度	无	0
	黏膜肌层	1
	肌层	2
	浆膜层	3
隐窝损伤	无	0
	基底 1/3 隐窝损伤	1
	基底 2/3 隐窝损伤	2
	仅有完整表面上皮	3
	全部上皮破坏	4

注:HE 是评估炎症严重程度的组织学标准。

菌上游引物 5'-AATAGCTCCTGGAAACGGGT-3', 下游引物 5'-TAGTTAGCCGGCGCTTATTC-3', 长度 243 bp; PCR 反应体系为 2 × Real-time PCR Mix 12.5 μL, 7.5 μmol·L⁻¹ 基因引物 2.0 μL, 反转录产物 2.5 μL, ddH₂O 8.0 μL。PCR 扩增: 预变性 94 °C 15 min, 循环(40 次) 95 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s。绘制溶解曲线, 结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法分析 mRNA 相对表达量。

2.4.4.2 结肠组织中 IL-1β mRNA 的表达 IL-1β 上游引物 5'-ACCTTCCAGGATGAGGA-3', 下游引物

5'-GATTCTTTCCTTTGAGGCCCA-3', 长度 187 bp; PCR 反应体系为 2 × Real-time PCR Mix 12.5 μL, 7.5 μmol·L⁻¹ 基因引物 2.0 μL, 反转录产物 2.5 μL, ddH₂O 8.0 μL。PCR 扩增: 预变性 94 °C 15 min, 循环(40 次) 95 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s。绘制溶解曲线, 结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法分析 mRNA 相对表达量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行实验数据统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析, 计数资料采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对溃疡性结肠炎大鼠一般情况的影响 TNBS 灌肠造模后 45 min, 模型鼠出现烦躁、竖毛等行为学表现, 造模 24 h 内大便均出现脓血黏液, 72 h 陆续出现发热、精神萎靡及毛色枯槁暗淡, 随机选取 2 只大鼠解剖, 观察结肠显示结肠明显充血水肿, 长度缩短, 表明造模成功; 给药后, 各给药组烦躁、脓血黏便及发热逐渐消失。模型组大鼠死亡率、体温均高于正常值, 体质量低于正常组 ($P < 0.05$); 各给药组大鼠体质量均高于模型组 ($P < 0.05$); 联合高剂量组死亡率低于丽珠肠乐组, 且体质量高于丽珠肠乐组 ($P < 0.05$); 联合低剂量组与丽珠肠乐组死亡率、体温及体质量差异无统计学意义。模型组 DAI 显著高于正常组大鼠 ($P < 0.05$), 各给药组 DAI 低于模型组 ($P < 0.05$), 联合高剂量组 DAI 低于丽珠肠乐组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 白头翁汤加减联合丽珠肠乐对溃疡性结肠炎大鼠一般情况的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of modified Baitouweng Tang combined with bifidobacterium on general condition of rats with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$)

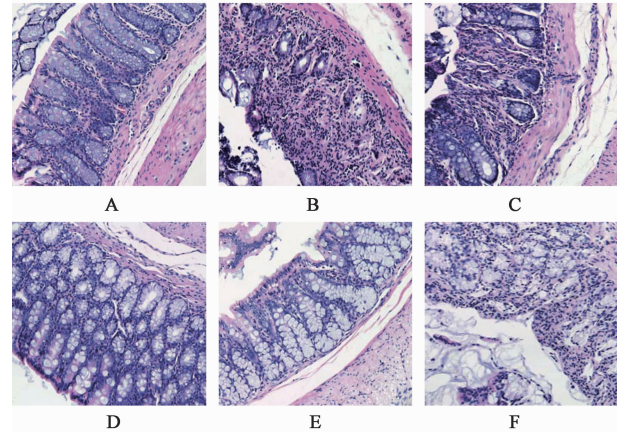
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	死亡/只	体温/°C	体质量/g	DAI 评分/分
正常	-	8	0	37.4 ± 0.4	242.7 ± 9.6	3.23 ± 1.25
模型	-	10	4 ¹⁾	39.4 ± 0.5 ¹⁾	171.4 ± 8.4 ¹⁾	6.23 ± 1.44 ¹⁾
丽珠肠乐	3.5	10	2	38.3 ± 0.4	180.5 ± 6.5 ²⁾	4.93 ± 1.31 ²⁾
联合	40 + 3.5	10	0 ^{2,3)}	37.6 ± 0.3 ²⁾	191.5 ± 5.8 ^{2,3)}	3.53 ± 1.57 ^{2,3)}
	20 + 3.5	10	2	37.8 ± 0.5 ²⁾	188.7 ± 5.2 ^{2,3)}	4.85 ± 1.09 ²⁾
	10 + 3.5	10	1	38.0 ± 0.4	183.6 ± 5.2 ²⁾	4.98 ± 1.76 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与丽珠肠乐组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 4~6 同)。

3.2 对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理组织学的影响 正常组结肠组织黏膜完整, 腺体排列整齐, 未见溃疡; 模型组腺体结构破坏紊乱, 大量中性粒细胞浸润, 隐窝损伤; 联合高剂量组结肠组织结构大体完整, 腺体结构相对完整, 少量中性粒细胞浸润, 未见

明显隐窝损伤。联合中剂量组结肠黏膜有缺损, 隐窝损伤, 部分中性粒细胞浸润, 可见部分腺体结构。联合低剂量组病理组织结构与丽珠肠乐组相似, 见中性粒细胞浸润, 残存少量腺体结构。各给药组 HE 评分低于模型组 ($P < 0.05$), 联合高剂量组 HE

评分低于丽珠肠乐组 ($P < 0.05$)。见图 1, 见表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 丽珠肠乐组; D. 联合高剂量组; E. 联合中剂量组; F. 联合低剂量组

图 1 白头翁汤加减联合丽珠肠乐对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理组织学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of modified Baitouweng Tang combined with bifidobacterium on colonic histopathology of rats with ulcerative colitis (HE, $\times 200$)

3.3 对溃疡性结肠炎大鼠血清 D-LA, DAO 和结肠组织 IL-8, IL-13 水平的影响

造模后 D-LA, DAO 和

表 4 白头翁汤加减联合丽珠肠乐对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理组织学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of modified Baitouweng Tang combined with bifidobacterium on colonic histology score of rats with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	病理评分/分
正常	-	8	0
模型	-	10	3.22 ± 0.53
丽珠肠乐	3.5	10	$2.20 \pm 0.35^{2)}$
联合	40 + 3.5	10	$1.20 \pm 0.13^{2,3)}$
	20 + 3.5	10	$1.93 \pm 0.67^{2)}$
	10 + 3.5	10	$1.98 \pm 0.35^{2)}$

IL-8 均升高, 与正常组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 IL-13 降低 ($P < 0.05$), 说明造模是成功的; 与模型组比较, 各给药组明显降低 D-LA, DAO 和 IL-8, 升高 IL-13 ($P < 0.05$); 与丽珠肠乐组比较, 联合高剂量组明显降低 D-LA, DAO 和 IL-8, 升高 IL-13 ($P < 0.05$); 联合中剂量组 D-LA 表达水平低于丽珠肠乐组 ($P < 0.05$)。见表 5。

3.4 对溃疡性结肠炎大鼠双歧杆菌和 IL-1 β mRNA

表 5 白头翁汤加减联合丽珠肠乐对溃疡性结肠炎大鼠血清 D-LA, DAO 和结肠组织 IL-8, IL-13 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of modified Baitouweng Tang combined with bifidobacterium on D-LA, DAO of serum and IL-8, IL-13 of colon tissue levels of rats with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	D-LA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	DAO/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-8/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-13/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	8	3.43 ± 0.35	6.78 ± 1.48	131.37 ± 15.81	42.73 ± 3.26
模型	-	10	$6.65 \pm 0.87^{1)}$	$10.15 \pm 1.76^{1)}$	$191.03 \pm 22.20^{1)}$	$27.50 \pm 3.31^{1)}$
丽珠肠乐	3.5	10	$4.84 \pm 0.91^{2)}$	$7.88 \pm 1.11^{2)}$	$170.00 \pm 8.63^{2)}$	$33.97 \pm 8.27^{2)}$
联合	40 + 3.5	10	$3.65 \pm 0.88^{2,3)}$	$6.91 \pm 1.28^{2,3)}$	$145.60 \pm 11.65^{2,3)}$	$39.94 \pm 10.93^{2)}$
	20 + 3.5	10	$4.03 \pm 1.02^{2,3)}$	$7.74 \pm 1.23^{2)}$	$161.49 \pm 6.83^{2)}$	$34.77 \pm 9.71^{2)}$
	10 + 3.5	10	$4.47 \pm 0.87^{2)}$	$7.87 \pm 1.05^{2)}$	$167.17 \pm 8.82^{2)}$	$33.12 \pm 8.46^{2)}$

相对水平的影响 正常组 UC 大鼠粪便中双歧杆菌 mRNA 相对含量高于模型组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各用药组大鼠粪便中双歧杆菌 mRNA 相对含量均有增加, 且以联合高剂量组最高, 各用药组与模型组组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合高剂量组双歧杆菌 mRNA 相对含量高于丽珠肠乐组 ($P < 0.05$), 联合中、低剂量组与丽珠肠乐组比较, 差异无统计学意义。与正常组比较, 模型组结肠组织 IL-1 β 的 mRNA 相对表达量明显升高 ($P < 0.05$), 经给药干预后各药物组 IL-1 β 的相对表达量显著下降 ($P < 0.05$), 而联合高剂量组 IL-1 β 的相对表达量低于丽珠肠乐组 ($P < 0.05$); 联合中、低剂量

组与丽珠肠乐组比较, 差异无统计学意义。见表 6。

表 6 白头翁汤加减联合丽珠肠乐对溃疡性结肠炎大鼠双歧杆菌和 IL-1 β mRNA 相对水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of modified Baitouweng Tang combined with bifidobacterium on on relative expression of bifidobacterium and IL-1 β mRNA of rats with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	双歧杆菌	IL-1 β
正常	-	$2.13 \pm 0.35^{2)}$	$0.36 \pm 1.48^{2)}$
模型	-	1	1
丽珠肠乐	3.5	$1.34 \pm 0.91^{2)}$	$0.78 \pm 1.11^{2)}$
联合	40 + 3.5	$1.85 \pm 0.88^{2,3)}$	$0.49 \pm 1.28^{2,3)}$
	20 + 3.5	$1.49 \pm 1.02^{2)}$	$0.57 \pm 1.23^{2)}$
	10 + 3.5	$1.46 \pm 0.87^{2)}$	$0.61 \pm 1.05^{2)}$

4 讨论

UC在亚洲的年发病率为1.0/10万~2.0/10万,患病率为4.0/10万~44.3/10万,我国推测UC患病率为11.6/10万,多发于20~49岁的青壮年,男性偏多^[16]。随着人们生活水平的不断提高,生活习惯、饮食结构改变,医学诊疗技术的不断革新,我国UC的发病率持续走高^[17]。慢性炎症时,大量促炎症因子损伤肠道上皮细胞、减弱肠上皮细胞间连接、黏蛋白分泌减少,破坏肠道黏膜层,削弱肠道表面保护,使肠道易受炎症因子攻击^[18]。UC的发生、发展与肠道微生物的改变密切相关,肠道微生物及其代谢产物可诱导遗传易感性个体的肠道黏膜免疫功能失调,产生免疫耐受,最终诱发肠道炎症。结肠的微生物浓聚区域刚好是UC的好发部位,微生物对肠道炎症的发生发展发挥了关键作用^[19]。近年有研究表明,益生菌通过补充UC肠道减少的有益菌群,促进肠道免疫功能恢复,增强肠道黏膜屏障^[20]。双歧杆菌通过其细胞壁上的磷壁酸与肠黏膜上皮细胞特异性结合,在肠道表面形成生物菌保护膜,是肠道中的优势菌种。双歧杆菌还能产生有机酸等代谢产物,调节肠道pH和氧化还原电位,减少肠道局部氧浓度,促进肠道蠕动,减少致病菌黏附,营造出益生菌生长的有利环境,抑制需氧的非正常菌群。双歧杆菌以定植于肠上皮细胞为首要条件发挥作用,定植是靠其黏附素及其受体的特异性结合,否则只能是过路菌,不能发挥作用。目前,普遍认为双歧杆菌的黏附机制是通过黏附素黏附到肠道上皮细胞^[21]。肠道益生菌在肠道发挥的作用逐渐引发关注,大家希望寻求突破,故白头翁汤加减和双歧杆菌制剂联合治疗UC的策略应运而生。

本实验采用2,4,6-TNBS复制UC大鼠模型,该UC模型因其比较接近于人类UC,且重复性较高而被广泛使用,是目前研究UC的重要模型。临床上运用白头翁汤加减是在白头翁汤基础上加减组成,经过大量临床验证,证明疗效显著。本研究制备急性溃疡性结肠炎动物模型模拟临床溃疡性结肠炎的活动期,实验结果显示给药组大鼠的一般情况明显好转,脓血便消失,体质量明显增高;丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度组死亡率低于丽珠肠乐组,且体质量高于丽珠肠乐组。各给药组DAI低于模型组,丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度组DAI低于丽珠肠乐组。光镜下观察,给药组病理改变明显好转,肠壁损伤修复,炎性细胞浸润减少;丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度组结肠组织结构大体完整,腺体结构

相对完整,少量中性粒细胞浸润,未见明显隐窝损伤。各给药组HE评分低于模型组,丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度组HE评分低于丽珠肠乐组。与模型组比较,各用药组结肠组织中双歧杆菌mRNA相对含量均有增加,且以丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度组最高。因此可推测丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度对溃疡性结肠炎有协同治疗作用,促进双歧杆菌定植于肠上皮细胞。

与UC密切相关的促炎症因子包括TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8等,可诱导趋化因子合成^[22]。促炎症因子能促进内皮细胞黏附分子的表达,诱导中性粒细胞等趋化性炎症细胞进入肠道病变部位。中性粒细胞被招募到肠黏膜,IL-8将其激活,并诱导促炎症因子的合成,提高血管通透性,释放酶类参与氧爆作用和组织损伤。IL-1 β 由单核细胞产生多肽类细胞因子,具有多种生物学活性。在免疫应答和炎症反应中起到关键作用,其在肠组织中的表达水平与肠黏膜炎症和坏死程度正相关,同时IL-1 β 能作用与多组织和器官,是UC发病的关键炎症因子^[23]。隐窝脓肿等病理改变表明UC处于活动期,IL-1 β 的表达水平与免疫球蛋白、白蛋白及 α -抗胰蛋白酶等标记蛋白丢失的量呈正相关^[24]。王雪等^[25]研究显示,UC患者结肠黏膜的吞噬细胞中IL-1 β 的表达较健康人显著升高,且与临床症状严重程度一致。因此,IL-1 β 对UC疾病严重程度的判断具有重要指导意义,对药物疗效的观察也有重要价值。细胞黏附分子(CD44)能趋化细胞黏附,促进炎症和免疫反应。典型的抗炎因子有IL-10,IL-13等,IL-13能上调单核细胞呈递抗原的能力,抑制其分泌多种炎症介质^[26]。血清D-LA水平可用来评估肠黏膜通透性及黏膜屏障损伤的程度,血清DAO水平可反映肠黏膜通透性的损伤和修复过程。各给药组与模型组比较,表现为D-LA,DAO和IL-8降低,IL-13升高;与丽珠肠乐组比较,丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度组D-LA,DAO和IL-8降低,IL-13升高;丽珠肠乐+白头翁汤加减中浓度组D-LA表达水平低于丽珠肠乐组。经给药干预后各药物组IL-1 β mRNA相对表达量显著下降,而丽珠肠乐+白头翁汤加减高浓度组IL-1 β 的相对表达量低于丽珠肠乐组。表明丽珠肠乐联合高浓度白头翁汤加减能下调促炎症因子IL-1 β ,IL-8表达,同时上调抗炎因子IL-13表达,降低肠黏膜通透性及减轻黏膜屏障损伤,达到调节免疫平衡、修复肠黏膜的作用,进而治疗UC。

本实验通过建立急性溃疡性结肠炎动物模型,

应用双歧杆菌制剂联合白头翁汤加减治疗 UC, 初步证实了高浓度白头翁汤加减联合双歧杆菌制剂治疗 UC 的协同作用。其机制可能是通过促进双歧杆菌定植于肠上皮细胞, 下调促炎症因子 IL-1 β , IL-8 表达, 同时上调抗炎因子 IL-13 表达, 降低肠黏膜通透性及减轻黏膜屏障损伤, 调节免疫平衡、修复肠黏膜。使用高浓度白头翁汤加减联合双歧杆菌制剂可有效治疗 UC, 且安全性较高, 值得临床推广应用。高浓度白头翁汤加减促进双歧杆菌定植于肠上皮细胞的机制为本课题组下一步研究。

[参考文献]

[1] Derix L A, Dieleman L A, Hoentjen F, et al. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2016, 30 (1): 55-63.

[2] 裴银奇, 赵党生. 溃疡性结肠炎中医药治疗研究进展 [J]. 中医研究, 2016, 29(9): 77-78.

[3] 刘建军, 邱明义, 陶春晖. 加味白头翁汤对溃疡性结肠炎大鼠组织学的影响 [J]. 河北中医, 2009, 31(10): 1152-1154.

[4] Bengtsson J, Adlerberth I, Östblom A, et al. Effect of probiotics (299 plus Bifidobacterium Cure21) in patients with poor ileal pouch function: a randomised controlled trial [J]. Scand J Gastroenterol, 2016, 51 (9): 1087-1092.

[5] Ait-Belgnaoui A, Payard I, Rolland C, et al. Comparative genome and methylome analysis reveals restriction/modification system diversity in the gut commensal Bifidobacterium breve [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 24(1): 1-18.

[6] Tursi A, Brandimarte G, Papa A, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study [J]. American J Gastroenterol, 2010, 105(10): 2218-2227.

[7] Scott F I, Aberra F N. Probiotics, prebiotics, and antibiotics for ulcerative colitis [J]. Springer New York, 2014, 45 (4): 209-220.

[8] 吴兵, 张声生, 李帷. 溃疡性结肠炎中医临床路径的实施评价研究 [J]. 北京中医药, 2013, 32 (6): 418-420.

[9] 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 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25 (6): 891-895.

[10] 黄继汉, 黄晓辉, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

[11] 孙平良, 耿曙光, 袁代解, 等. 安肠汤对溃疡性结肠炎

大鼠肠黏膜组织中内源性代谢物的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(19): 1678-1683.

[12] 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.

[13] 张海燕, 黄穗平, 黄绍刚, 等. 清热祛湿法对实验性溃疡性结肠炎大鼠黏膜损伤的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 354-356.

[14] 周云仙. 炎症性肠病患者生存质量调查及影响因素分析 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38 (1): 97-100.

[15] El-Ashmawy N E, Khedr N F, El-Bahrawy H A, et al. Roflumilast, type 4 phosphodiesterase inhibitor, attenuates inflammation in rats with ulcerative colitis via down-regulation of iNOS and elevation of cAMP [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 56(1): 36-42.

[16] 欧阳钦, Rakesh Tandon, K L Goh, 等. 亚太地区炎症性肠病处理共识意见 (一) [J]. 胃肠病学, 2008, 11(4): 233-238.

[17] 李骥, 钱家鸣. 解读建立我国炎症性肠病诊治中心质量控制指标的共识 [J]. 中华消化杂志, 2016, 55 (12): 976-978.

[18] 庄肇滕, 吕宾. 溃疡性结肠炎肠黏膜屏障损伤及其相关机制研究进展 [J]. 胃肠病学, 2012, 17 (8): 506-508.

[19] Hagan M, Cross R K. Safety of vedolizumab in the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Expert Opin Drug Saf, 2015, 14(9): 1473-1479.

[20] Barko P C, McMichael M A, Swanson K S, et al. The gastrointestinal microbiome: a review [J]. J Vet Intern Med, 2017, 98(S1): S85-89.

[21] 陈菡南. 双歧杆菌的生理功效及应用研究进展 [J]. 科技创新导报, 2010, 11(1): 1-3.

[22] Hansen J J. Immune Responses to Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2015, 15(10): 61-71.

[23] Iboshi Y, Nakamura K, Iwasa T, et al. Increased IL-17A/IL-17F expression ratio represents the key mucosal T helper/regulatory cell-related gene signature paralleling disease activity in ulcerative colitis [J]. J Gastroenterol, 2016, 14(9): 1-12.

[24] Bjarnason I. The use of fecal calprotectin in inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterol Hepatol, 2017, 13(1): 53-56.

[25] 王雪, 颜玉, 任秀英, 等. 益生菌对溃疡性结肠炎大鼠 IL-1 β /CD44 的作用 [J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37 (5): 24-28.

[26] 刘建军. 加味白头翁汤对溃疡性结肠炎大鼠治疗作用及其机制的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008.

[责任编辑 周冰冰]