

# 白屈菜红碱对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用

徐香琴, 黄松, 杜先华\*, 周家乐, 黄火娣  
(广州中医药大学, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:**研究白屈菜红碱对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及可能的作用机制。**方法:**选取 60 只 KM 小鼠采用乙酸灌肠建立小鼠溃疡性结肠炎模型,随机分为模型组,阳性药组,白屈菜红碱低、中、高剂量组(25,50,100 mg·kg<sup>-1</sup>),并设立正常组,每组 10 只。灌胃给药,正常组、模型组给予生理盐水;阳性药组给予 20 mg·kg<sup>-1</sup>美沙拉嗪。连续给药 7 d 后,观察白屈菜红碱对小鼠一般情况、结肠黏膜组织损伤的影响;试剂盒测结肠和血清中髓过氧化物酶(MPO)的活性和一氧化氮(NO)的含量;酶联免疫吸附法(ELISA)检测结肠和血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平变化。**结果:**与正常组相比,模型组结肠组织损伤严重,MPO,NO,TNF- $\alpha$ 的水平明显降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,阳性药组和白屈菜红碱组结肠组织损伤情况明显减轻,美沙拉嗪与白屈菜红碱可改善升高 MPO,NO,TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**白屈菜红碱对乙酸诱导的小鼠溃疡性结肠炎有治疗作用,作用机制可能与其炎症因子 NO,TNF- $\alpha$ 的产生有关。

**[关键词]** 白屈菜红碱; 溃疡性结肠炎; 髓过氧化物酶; 一氧化氮; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0171-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210171

## Effect of Chelerythrine on Ulcerative Colitis in Mice

XU Xiang-qin, HUANG Song, DU Xian-hua\*, ZHOU Jia-le, HUANG Huo-di  
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic effect of chelerythrine on experimental ulcerative colitis and possible mechanism. **Method:** Acetic acid-induced ulcerative colitis (UC) mice model was prepared. 60 mice were randomized into model group, positive group, chelerythrine low, medium and high dose groups (25, 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup>), and a normal group was set up, 10 mice was included in each group. The general condition and pathological changes were observed. Myeloperoxidase (MPO) activity and nitric oxide (NO) levels in colon tissue and serum were determined by biochemical assay. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) levels in colon tissue and serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the normal group, the injury of colonic tissue in model group was serious, the level of MPO, NO, TNF- $\alpha$  was significantly lower ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, chelerythrine and etiasa significantly alleviated the damage of colonic tissue. The activities of MPO and NO, TNF- $\alpha$  levels were also obviously decreased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Chelerythrine may play its therapeutic role through inhibiting the inflammation due to the generation of NO, TNF- $\alpha$ .

**[Key words]** chelerythrine; ulcerative colitis; myeloperoxidase; nitric oxide; tumor necrosis factor- $\alpha$

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是一种慢性非特异性炎症。在我国,随着人们生活水平的提

高和饮食习惯的改变,导致以该病为代表的一些肠道疾病的增加,逐渐引起了人们的重视<sup>[1]</sup>。到目前

**[收稿日期]** 20140703(015)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2012BAI29B00)

**[第一作者]** 徐香琴,在读硕士,从事中药新药研究与开发,Tel:15622108613,E-mail:506709322@qq.com

**[通讯作者]** \*杜先华,博士,副教授,从事中药药理研究,Tel:020-39358183,E-mail:dshbeijing@163.com

为止,溃疡性结肠炎的病因及发病机制尚未完全明确,研究表明肠黏膜出现慢性炎症可能与基因、环境、微生物及免疫功能的失调等多种因素相互作用有关<sup>[2]</sup>。临床治疗仍以氨基水杨酸、类固醇激素和免疫抑制剂类药物为主,控制炎症、调节免疫、对症支持是目前治疗的侧重点。然而,利用动物模型,对口医药治疗 UC 的现代机制研究则相对较少,这在一定程度上限制了中医药在 UC 治疗中的发展速度和研究深度<sup>[3]</sup>。因此建立动物模型,寻找有效治疗溃疡性结肠炎的新药逐步成为研究的热点。白屈菜红碱(chelerythrine)系中药博落回 *Macleaya cordata* 中所提取的一种苯并菲啶型生物碱<sup>[4]</sup>,国内外研究表明,白屈菜红碱具有抗肿瘤、抗菌、抗炎等多种药理作用。实验就白屈菜红碱对 UC 的治疗作用进行探讨,研究建立小鼠 UC 模型,观察不同浓度白屈菜红碱治疗后小鼠肠道病理学改变及肠道黏膜和血清中髓过氧化物酶(MPO)、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )的含量变化,为其后继研究提供基础。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 白屈菜红碱(广州中医药大学新药开发研究中心,批号 20120908,纯度  $\geq 95\%$ );美沙拉嗪缓释颗粒(法国爱的发制药有效公司,批号 20120926);TNF- $\alpha$  试剂盒(武汉博士德,批号 S24009012);髓过氧化物酶(南京建成,批号 20121106)、NO 试剂盒(南京建成,批号 20121009)、考马斯亮蓝试剂盒(南京建成,批号 20121121)。

**1.2 动物** 4~5 周龄昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,由广州中医药大学实验动物中心提供,SPF 级,合格证号 SYXK(粤)2003-0001。

**1.3 仪器** UV-Vis 分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司),WH-861 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司),T10BASIC 匀浆机(广州 IKA 公司),电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),低温离心机(江西飞鹤离心机制造有限公司),CU600 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),CKX-41-32 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** 将小鼠随机分为正常组、UC 模型组、UC + 美沙拉嗪组、UC + 白屈菜红碱低、中、高剂量组(25,50,100 mg·kg<sup>-1</sup>)组,每组 10 只。

**2.2 小鼠溃疡性结肠炎模型的建立** 参照文献方法<sup>[7]</sup>制作溃疡性结肠炎模型:小鼠禁食、不禁水 24 h 后,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,小鼠取头低尾高体

位,将聚乙烯导管经肛门缓慢插入结肠 3 cm 并经其注入 5% 乙酸 0.2 mL,捏紧小鼠肛门倒提 30 s 后,注入生理盐水 1 mL 冲洗,正常组注入等量生理盐水对照,造模结束后让小鼠平躺,自然清醒,常规饲养。

**2.3 药物干预及观察小鼠一般状况** 造模后次日给药,正常组和模型组每天灌胃等体积的生理盐水;阳性药物组:美沙拉嗪 20 mg·kg<sup>-1</sup>,隔天腹腔注射给药;白屈菜红碱低、中、高剂量组(25,50,100 mg·kg<sup>-1</sup>),每天 ig 给药,连续给药 7 d,每天 1 次。各组小鼠给药期间观察小鼠活动情况、精神状态、皮毛色泽、粪便等。

**2.4 动物的处理** 末次给药 24 h 后摘眼球取血,处死小鼠。取出肛门至盲肠末端的整个结肠和直肠段,沿肠系膜纵轴剪开,预冷生理盐水冲洗干净,滤纸吸干,肉眼观察各组小鼠结肠的大体改变,测量结肠长度及记录湿重。剪取病变最严重的结肠 1 cm,4% 甲醛固定、石蜡包埋、切片(厚 4  $\mu$ m),HE 染色,观察病理改变,其余结肠置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

**2.5 肠质量指数计算** 计算公式为:

$$\text{肠质量指数} = \frac{\text{结肠长度}/\text{m}}{\text{结肠湿重}/\text{g}} \times 100\%$$

**2.6 结肠组织中 MPO,NO 活性及 TNF- $\alpha$  水平测定** 将结肠组织用冰生理盐水制成 10% 的组织匀浆,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液严格按照说明书测定 MPO 和 NO 的活性。组织蛋白测定采用考马斯亮蓝试剂盒。结肠组织制成匀浆后置于 -20  $^{\circ}$ C 过夜,经反复冻融 2 次处理破坏细胞膜,组织匀浆液于 2~8  $^{\circ}$ C 下以 5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,吸取上清,按照 ELISA 试剂盒操作检测组织 TNF- $\alpha$  浓度。

**2.7 血清中 MPO,NO 活性及 TNF- $\alpha$  水平测定** 各组小鼠末次给药 24 h 后眼球取血,分离血清,参照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书方法操作,测定血清中 MPO 和 NO 的活性。采用 ELISA 法,按试剂盒操作说明进行 TNF- $\alpha$  水平测定。

**2.8 统计学处理** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS 17.0 统计软件分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  时差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 小鼠一般情况** 正常组小鼠精神状态良好,活跃,毛发亮泽,大便成形,无腹泻和便血;模型组小鼠精神萎靡,活动明显减少,毛发无光泽,大便稀软或腹泻,部分出现肉眼血便;给药组有不同程度的缓解。

**3.2 结肠长度、肠质量指数** 各组末次给药后,模

型组结肠明显短缩,美沙拉嗪组和白屈菜红碱高、中剂量组的结肠与模型组比显著增长,差异具有显著性( $P < 0.01, P < 0.05$ );各组末次给药后,模型组肠质量指数最小,美沙拉嗪组与白屈菜红碱高、中、低剂量组的肠质量指数和模型组相比有显著性差异( $P < 0.01, P < 0.05$ )。见表1。

**3.3 结肠病理变化** 正常组小鼠结肠黏膜完整光滑,未见糜烂及溃疡;模型组见结肠黏膜弥漫性的充血肿胀、表面糜烂,部分可见溃疡形成;其余各组黏膜充血水肿减轻,较模型组明显好转。见图1。

表1 白屈菜红碱对溃疡性结肠炎小鼠结肠长度、肠质量指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	结肠长度	肠质量指数
		/cm	/%
正常	-	8.62 ± 0.76 <sup>2)</sup>	30.03 ± 3.92 <sup>2)</sup>
模型	-	6.30 ± 1.48	21.46 ± 3.20
美沙拉嗪	20	8.35 ± 0.73 <sup>2)</sup>	26.11 ± 1.25 <sup>2)</sup>
白屈菜红碱	25	6.84 ± 0.83	24.65 ± 1.90 <sup>1)</sup>
	50	7.34 ± 0.71 <sup>1)</sup>	24.45 ± 2.23 <sup>1)</sup>
	100	8.25 ± 0.43 <sup>2)</sup>	27.48 ± 2.41 <sup>2)</sup>

注:与模型组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05, ^{2)}$  $P < 0.01$ (表2~3同)。

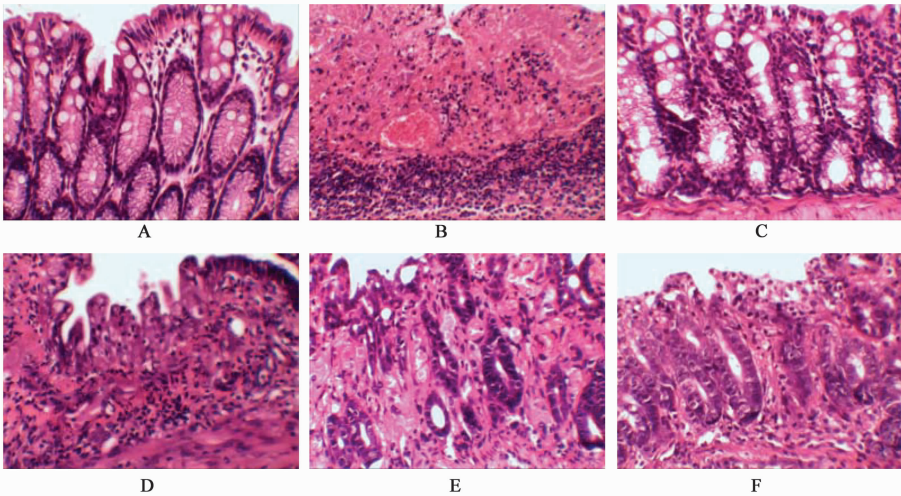


图1 白屈菜红碱对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理变化的影响(HE, ×400)  
A. 正常组;B. 模型组;C. 美沙拉嗪 20 mg·kg<sup>-1</sup>组;D. 白屈菜红碱 25 mg·kg<sup>-1</sup>组;  
E. 白屈菜红碱 50 mg·kg<sup>-1</sup>组;F. 白屈菜红碱 100 mg·kg<sup>-1</sup>组

**3.4 对结肠组织及血清中 MPO, NO 含量的影响** 模型组 MPO 和 NO 含量明显高于正常组( $P < 0.01, P < 0.05$ );白屈菜红碱各剂量组可不同程度降低血清及结肠组织中 MPO 和 NO 含量( $P < 0.01, P < 0.05$ )。见表2。

**3.5 白屈菜红碱对 TNF- $\alpha$  的影响** 模型组中 TNF- $\alpha$  含量明显高于正常组( $P < 0.01$ );白屈菜红碱各剂量组对 UC 小鼠血清及结肠组织中 TNF- $\alpha$  含量均有不同程度的降低作用( $P < 0.01, P < 0.05$ )。见表3。

表2 白屈菜红碱对溃疡性结肠炎小鼠血清及结肠组织中 MPO 和 NO 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	MPO		NO	
		血清/U·L <sup>-1</sup>	组织/U·g <sup>-1</sup>	血清/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	组织/ $\mu$ mol·g <sup>-1</sup>
正常	-	51.36 ± 14.47 <sup>2)</sup>	0.52 ± 0.13 <sup>2)</sup>	335.85 ± 33.19 <sup>2)</sup>	114.77 ± 10.87 <sup>2)</sup>
模型	-	149.85 ± 27.09	2.23 ± 0.85	440.85 ± 10.84	288.43 ± 16.79
美沙拉嗪	20	71.75 ± 9.04 <sup>2)</sup>	0.74 ± 0.12 <sup>2)</sup>	356.30 ± 12.69 <sup>2)</sup>	156.30 ± 8.15 <sup>2)</sup>
白屈菜红碱	25	104.28 ± 25.41 <sup>1)</sup>	1.68 ± 0.95	418.77 ± 10.37 <sup>1)</sup>	283.88 ± 21.53
	50	120.55 ± 10.81 <sup>2)</sup>	1.82 ± 0.83	392.16 ± 11.52 <sup>1)</sup>	231.66 ± 15.81 <sup>2)</sup>
	100	75.52 ± 11.36 <sup>2)</sup>	0.79 ± 0.13 <sup>2)</sup>	367.51 ± 9.66 <sup>2)</sup>	153.18 ± 10.39 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

结肠长度及组织病理学改变在 UC 的实验研究

中是衡量肠组织损伤程度的重要指标,可评价药物对 UC 小鼠肠组织炎症及损伤的治疗效果。实验结

表 3 白屈菜红碱对小鼠血清及结肠组织中  
TNF- $\alpha$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	
		血清 /ng·L <sup>-1</sup>	结肠组织 /ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	101 $\pm$ 9 <sup>2)</sup>	2 016 $\pm$ 484 <sup>2)</sup>
模型	-	280 $\pm$ 28	2 933 $\pm$ 592
美沙拉嗪	20	127 $\pm$ 33 <sup>2)</sup>	2 229 $\pm$ 541 <sup>1)</sup>
白屈菜红碱	25	265 $\pm$ 36	2 922 $\pm$ 431
	50	257 $\pm$ 25 <sup>1)</sup>	2 776 $\pm$ 194
	100	211 $\pm$ 26 <sup>2)</sup>	2 392 $\pm$ 551 <sup>2)</sup>

果显示:各组末次给药后,模型组结肠缩短明显,HE 染色观察可见典型的急性炎症表现;美沙拉嗪药组和白屈菜红碱高、中、低组结肠缩短现象较为好转,HE 染色观察发现肠黏膜炎症不同程度的减轻。提示白屈菜红碱对小鼠 UC 有一定的治疗作用。

MPO 在中性粒细胞中可使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成某些氧化物,诱导中性粒细胞和巨噬细胞自身的致炎作用,使肠道炎症进一步加重。因此,MPO 含量可作为评价 UC 肠道组织炎症程度的重要指标<sup>[8-9]</sup>。研究中白屈菜红碱能降低 UC 模型小鼠结肠组织和血清中 MPO 含量,减少中性粒细胞浸润,从而改善结肠炎症状。

研究显示,结肠炎症因子 iNOS 诱导产生大量的 NO,是 UC 中一种重要的促炎因子;UC 患者病变黏膜中 NO 浓度的增加与炎症程度是互相平行的<sup>[10]</sup>。由单核巨噬细胞产生的 TNF- $\alpha$  是目前公认的能介导 UC 发病的促炎细胞因子,它促使中性粒细胞进入肠道病变部位,引起一系列的病理变化导致 UC 的形成<sup>[11-12]</sup>。TNF- $\alpha$  能激活低氧诱导因子 (HIF-1 $\alpha$ ) 蛋白的表达,继而迅速诱导 iNOS 基因的表达产生大量的 NO,从而参与 UC 的炎症反应和免疫调节,TNF- $\alpha$  与 iNOS 蛋白表达存在一定的正相关。

实验结果表明白屈菜红碱在减轻 UC 小鼠结肠炎症的同时,血清与结肠组织中的 NO, TNF- $\alpha$  的水

平均明显下降,提示白屈菜红碱减轻肠黏膜的炎症程度可能与其下调结肠黏膜的 TNF- $\alpha$  与 iNOS 蛋白表达有关,关于白屈菜红碱具体的作用机制有待进一步深究。

[参考文献]

[ 1 ] 何仙泉. 溃疡性结肠炎的临床特征分析 [J]. 吉林医学, 2011, 32(6) : 3289.

[ 2 ] Hendrickson B A, Gokhale R, Cho J H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(1) : 79.

[ 3 ] 王立春, 马鑫. 慢性溃疡性结肠炎治疗进展 [J]. 中国医疗前沿, 2008(2) : 37.

[ 4 ] 王培卿, 尹震花, 康文艺. 白屈菜红碱药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17) : 2745.

[ 5 ] 黄循伽, 王瑞幸, 王承党, 等. 补黄丹对乙酸致小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用 [J]. 福建医科大学学报, 2006, 40(5) : 478.

[ 6 ] 罗凤燕, 白爱平. 溃疡性结肠炎动物模型的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(7) : 607.

[ 7 ] 黄芸, 董蕾. 马齿苋对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19) : 2727.

[ 8 ] 景明, 罗永皎, 陈正君, 等. 藏药湿生扁蕾对三硝基苯磺酸诱导的大鼠溃疡性结肠炎模型的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2) : 351.

[ 9 ] 姚君, 王立生, 王建尧, 等. 双歧杆菌抑制溃疡性结肠炎小鼠结肠氧化应激和 NADPH 氧化酶表达 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26(14) : 2491.

[ 10 ] 金惠铭. 病理生理学 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000 : 150.

[ 11 ] Dieleman L A, Ridwan B U, Tennyson G S, et al. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice [J]. Gastroenterology, 1994, 107(6) : 1643.

[ 12 ] Tomoyose M, Mitsuyama K, Ishida H, et al. Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. Scandi J Gastroenterol, 1998, 33(4) : 435.

[责任编辑 聂淑琴]