

痛泻要方加减防风对实验性 UC 大鼠结肠黏膜的影响

时军¹, 李昕², 张小灵¹, 郭嘉俊¹

(1. 广东药学院 中药学院, 广州 510006; 2. 广东药学院 第一附属医院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**观察痛泻要方中加减防风的分量对溃疡性结肠炎(UC)结肠黏膜过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR- γ)蛋白的影响,探讨防风在方中的作用。**方法:**雌性SD大鼠60只,随机分为6组,每组10只。用50% 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)乙醇液复制大鼠UC模型,药物组按生药18, 20, 22 g·kg⁻¹剂量,分别灌胃给予缺防风方、防风减量方及全方提取物,阳性组按0.3 g·kg⁻¹剂量给予柳氮磺吡啶(SASP),灌胃体积均为10 mL·kg⁻¹,空白组、模型组灌服等量生理盐水,持续给药28 d。从大鼠体重变化、结肠组织黏膜损伤指数及结肠病理切片等方面考察痛泻要方加减防风的量对溃疡性结肠炎的防治作用,采用免疫组化检测PPAR- γ 蛋白表达水平。**结果:**肉眼观察模型组大鼠结肠组织黏膜层可见炎症和溃疡形成,与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),证实造模成功。模型组大鼠结肠组织PPAR- γ 蛋白表达量均低于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后,痛泻要方全方组PPAR- γ 基因和蛋白表达量较防风减量组、缺防风组有明显升高,全方组及防风剂量减半组与模型组差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**防风作为痛泻要方的使药,有引导药物进入病变部位的作用,防风用量在一定程度上决定痛泻要方对UC的治疗效果。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 痛泻要方; 防风; 使药

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0161-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040161

Influence of Tongxie Yaofang with or Without Saposhnikoviae Radix Colonic Mucosa in Rats with Experimental Ulcerative Colitis SHI Jun¹, LI Xin², ZHANG Xiao-ling¹, GUO Jia-jun¹ (1. School of Chinese Materia Medicine Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the impact of Saposhnikoviae Radix of Tongxie Yaofang decoction on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ) protein expression in the ulcerative colitis rats, and to explore the role of Saposhnikoviae Radix. **Method:** Sixty female SD rats were randomly divided into 6 groups, 10 rats in each group. The rat ulcerative colitis (UC) model was made with 50% 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ethanol solution. The corresponding prescription without and with Saposhnikoviae Radix, half dose of Saposhnikoviae Radix were orally given, the dose was 18, 20, 22 g·kg⁻¹, positive group was given salicylazosulfapyridine (SASP) at dose of 0.3 g·kg⁻¹. The weight change, the colon mucosa damage index and colon pathology were observed, and immunohistochemical detection of PPAR- γ protein expression level was carried out. **Result:** The model group rats had colon mucosa inflammation and ulcer formation, compared with the blank group the result was statistically significant ($P < 0.05$). Expression of PPAR- γ protein in model group rats colon tissue was lower than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After the treatment, PPAR- γ protein expression level in Tongxie Yaofang decoction group was significantly higher than that in groups without or reduced Saposhnikoviae Radix ($P < 0.05$). **Conclusion:** Saposhnikoviae Radix is minister drug in Tongxie Yaofang decoction, its dosage has significant impact on action of the decoction.

[Key words] ulcerative colitis; Tongxie Yaofang decoction; Saposhnikoviae Radix; minister drug

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是以腹痛、泄泻、脓血便持续或反复发作为主要症状的疾病,该

病发病机制尚不明确,具有病变范围广泛、病情反复发作且易癌变等特点,已被WHO确定为现代难治病^[1]。中医认为,“春伤于风,夏生后泄肠澼”,肠澼证似肠风下血而有痛坠,即为如今的UC^[2]。有关UC的病因病机的探讨及治疗药物的研发已成为近年来的研究热点,许多免疫抑制剂如柳氮磺吡啶、皮质激素、甲氨蝶呤等具有调控炎症的活性作用,而被临床治疗所认可^[3]。然而,应用这些免疫抑制剂,易引起钙调节蛋白酶和蛋白酶体的活性受到影响,干扰细胞的功能和周期调节,临床应用尚存在较大争议^[4]。有研究报道,过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR- γ)的表达与UC的发病密切相关,临床上运用PPAR- γ 激动剂可以缓解UC患者临床症状^[5]。

痛泻要方最早载于《丹溪心法》,全方组成为炒白术二两、炒白芍二两、炒陈皮一两半、防风一两。原方无方名,张景岳命为今名。已有研究证实,痛泻要方可促进实验性UC大鼠结肠黏膜PPAR- γ 蛋白和基因表达,从而发挥抑制免疫系统的过度激活作用,缓解UC的腹泻、溃疡等症状^[6]。防风可“理脾引经”,达到补脾土而泻肝木的“抑木扶土”作用,历代医家解析痛泻要方均认为,防风为该方使药,可引导方中诸药到达病变部位^[7]。为观察防风的引药作用,本研究采用减少防风剂量或去除防风的方法,观察痛泻要方全方或缺方对实验性UC大鼠腹泻、溃疡症状,以及结肠黏膜PPAR- γ 蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠60只,体重(200±20)g,雌雄各半,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2011-0015。

1.2 试剂及仪器 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma公司,批号2013-16-2),一抗PPAR- γ ,SP免疫组化染色试剂盒,DAB染色试剂盒(北京博奥森生物工程开发有限公司),柳氮磺胺嘧啶(SASP,批号20130718,湖北拓楚慷元医药化工有限公司)。

美国伯乐Bio-Rad型凝胶成像仪(北京赛百奥科技有限公司),Sigma3K15型通用台式高速离心机(北京博励行仪器有限公司),DW-HL538型中科美菱超低温冰箱(合肥美菱股份有限公司),太盟BI-2000型图像分析系统(成都泰盟软件有限公司),BPN-50CH型CO₂培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 药物 炒白术、炒白芍、炒陈皮、防风饮片均购于安徽归然药业有限公司,经广东药学院中药学院

马鸿雁副教授鉴定,为2010年版《中国药典》正品。按痛泻要方4:4:3:2的比例取炒白术、炒白芍、炒陈皮、防风,用8倍量70%乙醇每次回流2h,提取3次,合并醇提液,滤过,滤液减压回收乙醇后得醇提浓缩液,减压干燥得干膏,粉碎成细粉,冰箱保存备用。

将痛泻要方中防风的剂量减半或去除防风,同上述方法制备浸膏细粉,冰箱保存备用。

2 方法

2.1 UC大鼠造模 采用TNBS/乙醇溶液灌肠法制作UC大鼠模型。将Wistar大鼠60只,禁食(不禁水)24h,用10%水合氯醛腹腔麻醉(3 mL·kg)后,一次性将50%TNBS乙醇液(0.25 mL)用橡胶输液管缓慢注入大鼠距肛门约7~8 cm深的肠腔内,留置数分钟。然后用针头抽取一定量的空气,同样的方法注入大鼠直肠肠腔,防止溶液外漏,让动物保持平躺状态,自然清醒。空白组10只大鼠也采用此法,用等量的生理盐水灌肠。

2.2 分组与给药 将实验动物分为6组:空白组、模型组,痛泻要方A(缺防风),B(防风减半),C(全方)组及SASP组,每组10只。除空白组外,均以50%TNBS乙醇液(0.25 mL)灌肠。痛泻要方A,B,C组分别按生药18,20,22 g·kg⁻¹剂量 ig (按临床成人用量10倍折算),SASP组按0.3 g·kg⁻¹剂量 ig ,体积均为10 mL·kg⁻¹,空白组、模型组灌服等体积的生理盐水。各组于造模后第2日开始 ig ,1次/d,连续28 d。4周后处死,无菌状态下解剖取结肠组织标本。

2.3 观察指标 从造模日开始,每日称量大鼠重,每日观察大鼠粪便的性状和次数。干、稀粪便的区分以滤纸上有无痕迹为准。以每粒或每堆(不能分清粒数者)为1次,计量12 h稀便次。稀便率是每只动物所排的稀便数与总便数比率。

2.4 取材 大鼠禁食(不禁水)24 h后,脱颈椎处死大鼠,打开腹腔,取出距肛门以上7~8 cm处结肠段,沿肠系膜边缘小心剪开肠腔,用0~4℃PBS缓冲液冲洗肠内容物,肉眼观察各组大鼠肠组织大体形态情况记录并进行评分,取病变最明显处0.5 cm²左右,迅速移至液氮中保存。大体形态损伤评分参照Luketal标准进行,0分:无炎症和溃疡;1分:局部充血但无溃疡;2分:充血而且肠壁变厚但没有溃疡;3分:有1处溃疡及炎症,直径约0~1 cm;4分:2处或2处以上溃疡及炎症,直径约1~2 cm,但肠管与外周脏器无粘连;5分:溃疡延伸超过2 cm,肠

管增厚,与周围脏器粘连严重。

2.5 PPAR- γ 蛋白表达检测^[6] 采取 SABC 法检测,其主要步骤如下:将固定好的石蜡切片常规脱蜡至水。每张组织切片滴加 2 滴 3% H₂O₂ 溶液,室温放置 10 min。将切片浸入 0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中进行抗原热修复,自然冷却至室温,滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min。分别滴加 PPAR- γ 一抗,4℃ 冰箱过夜。滴加山羊抗兔 IgG,在 37℃ 培养箱中孵育 20 min。滴加试剂 SABC,在 37℃ 培养箱中孵育 20 min。DAB 显色剂,苏木素轻度复染 3 min;经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在显微镜下观察结果,拍片。染色对照:同一组切片中,用 PBS 代替一抗作孵育,其余步骤同上。采用 BI-2000 图像分析系统,随机选取 5 个视野,测量阳性细胞累积吸度 IA,IA 值大,蛋白表达多,反之则表达少。PPAR- γ 表达阳性为胞质呈棕黄褐色颗粒染

色,颜色越深,表达越强,未出现棕黄褐颗粒,为阴性。

3 结果

3.1 一般状态 模型组大鼠在造模第 2 日开始出现稀便,摄食量显著减少,不主动觅食,1 周内体重明显下降,毛色晦暗无光泽且被粪便沾染,持续稀便,部分大鼠有脓血便。各治疗组中痛泻要方防风组,痛泻要方防风减半组症状缓解较慢,毛色仍稍显晦暗无光泽,食量较少,扎堆、稀便及血便症状缓解不明显,不活跃,其中痛泻要方防风减半组情况略优于痛泻要方防风组。痛泻要方全方组、SASP 组随着给药时间的持续,症状明显好转,大部分大鼠稀便症状消失,基本恢复正常,粪便呈灰褐色颗粒状,毛色逐渐转为光亮润泽,食量正常,活跃,体质量增长。各治疗组中以痛泻要方全方组和 SASP 组症状改善最为明显。各组动物体重变化见表 1。各组小鼠稀便率、稀便次数比较见表 2。

表 1 痛泻要方加减防风对 UC 大鼠体重变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Tongxie Yaofang decoction on body weight change of colonic mucosal injury UC rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体重/g				
		开始	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
空白	-	197.2 ± 16.2	203.1 ± 15.7	210.3 ± 18.2	218.9 ± 23.1	231.6 ± 24.1
模型	-	199.9 ± 15.4	176.3 ± 16.7 ¹⁾	173.8 ± 14.6 ¹⁾	168.9 ± 19.8 ²⁾	166.5 ± 19.6 ²⁾
痛泻要方(缺防风)	18	204.3 ± 17.9	183.9 ± 13.5	181.3 ± 19.3	183.1 ± 18.2	181.6 ± 15.3
痛泻要方(防风减半)	20	201.2 ± 19.1	186.2 ± 21.2	191.3 ± 20.1	199.6 ± 22.6 ³⁾	204.1 ± 16.2 ³⁾
痛泻要方(全方)	22	207.6 ± 13.8	193.7 ± 17.8	203.6 ± 16.4 ³⁾	208.1 ± 19.8 ⁴⁾	211.7 ± 15.3 ⁴⁾
SASP	3	205.6 ± 9.3	194.8 ± 19.1	199.7 ± 20.3 ³⁾	210.5 ± 13.2 ⁴⁾	215.7 ± 17.1 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, 与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(表 2~3 同)。

表 2 痛泻要方加减防风对 UC 大鼠每日平均稀便率、稀便次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

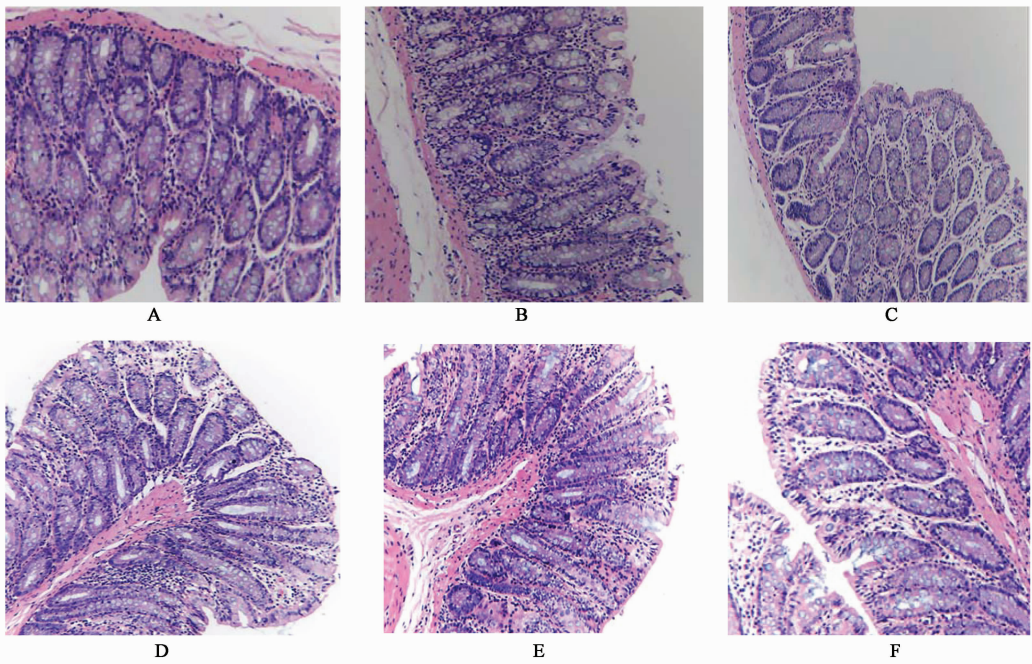
Table 2 Effects of Tongxie yaofang decoction on average loose stools ratio and frequency of colonic mucosal injury UC rats daily($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	稀便率	稀便数 /次/d
空白	-	-	-
模型	-	0.91 ± 0.13 ²⁾	5.6 ± 2.4 ²⁾
痛泻要方(缺防风)	18	0.84 ± 0.31	4.8 ± 2.2
痛泻要方(防风减半)	20	0.47 ± 0.17 ³⁾	4.2 ± 1.6 ³⁾
痛泻要方(全方)	22	0.24 ± 0.11 ⁴⁾	2.4 ± 0.6 ⁴⁾
SASP	3	0.21 ± 0.14 ⁴⁾	2.2 ± 0.6 ⁴⁾

3.2 结肠黏膜损伤情况 模型组大鼠结肠黏膜可见明显的充血、水肿、溃疡、肠壁变厚、肠道缩短。经

过痛泻要方及 SASP 治疗后大鼠结肠黏膜损伤情况均明显改善,但各组具体情况不相同,其中痛泻要方全方组及 SASP 组各大鼠黏膜仅有少量的充血水肿,其余损伤恢复正常,痛泻要方全方组, SASP 组与模型组比较,评分明显降低,差异有统计学意义(P < 0.01)。痛泻要方各治疗组随着防风用量增加,评分逐渐降低,痛泻要方全方组与 SASP 组相比较,评分差异无统计学意义。见表 3。

3.3 PPAR- γ 蛋白表达 免疫组化 PPAR- γ 表达 IA 及图像显示:空白组 PPAR- γ 蛋白大量表达;模型组大鼠结肠组织 PPAR- γ 蛋白的表达量均低于空白组,差异有统计学意义(P < 0.01);痛泻要方防风减半组及痛泻要方全方组 PPAR- γ 蛋白表达量均较模型组升高,差异有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01),与 SASP 组区别不大。见表 3,图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 痛泻要方防风 18 g·kg⁻¹组; D. 痛泻要方防风减半 20 g·kg⁻¹组; E. 痛泻要方 22 g·kg⁻¹组; F. SASP 3 g·kg⁻¹组
图 1 痛泻要方加减防风对 UC 大鼠结肠黏膜损伤 PPAR-γ 蛋白表达的影响(免疫组化, ×40)

Fig. 1 Effects of PPAR-γ protein expression of colonic mucosa damage UC rats of Tongxie Yaofang decoction (immunohistochemical staining, × 40)

表 3 痛泻要方加减防风对 UC 大鼠结肠黏膜损伤评分及 PPAR-γ 蛋白表达的影响(̄x ± s, n = 10)

Table 3 UC model rat colon mucosa injury score and expression of PPAR-gamma protein average optical density effect of Tongxie Yaofang decoction dose groups(̄x ± s, n = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	结肠黏膜损伤 评分/分	PPAR-γ 蛋白表达 / IA
空白	-	0.08 ± 0.23	0.47 ± 0.02
模型	-	2.67 ± 1.04 ¹⁾	0.25 ± 0.03 ¹⁾
痛泻要方(缺防风)	18	2.28 ± 1.91	0.31 ± 0.01
痛泻要方(防风减半)	20	1.69 ± 1.32 ³⁾	0.37 ± 0.02 ²⁾
痛泻要方(全方)	22	0.89 ± 0.78 ³⁾	0.43 ± 0.01 ³⁾
SASP	3	0.84 ± 0.82 ³⁾	0.41 ± 0.01 ³⁾

4 讨论

《景岳全书》卷二十四：“痢疾一证，即《黄帝内经》之肠澼也”，源于此书的痛泻要方，是治疗肠澼证的代表方剂，由炒白术、炒白芍、炒陈皮和防风组成，对久泻久痢甚验，总有效率超过 90%。该方以清热利湿为治则，防风补脾土而泻肝木，祛风调气机以止痛泻，发挥舒脾止泻之功^[8]。

目前对 UC 的治疗，以控制炎症、调节免疫、对症治疗为主，主要治疗药物为磺胺类抗炎药、免疫抑制剂。UC 病变局限于大肠黏膜及黏膜下层，但仅仅依靠局部抗炎效果难以控制复发，而且对深度溃

疡无法奏效，免疫抑制剂的副作用限制了其长期应用。

脑-肠互动调节是近年来的研究热点，由于脑肠轴(gut-brain axis, GBA)的存在，构建起大脑和肠道功能整合的神经介质的双向应答系统，在肠道功能失调方面提供很多病理生理学解释，并不断有证据表明，肠黏膜组织内神经递质和基质细胞在肠道的炎症性失调如炎症性肠病中起到关键作用^[9]。肠平滑肌细胞及上皮细胞是肠黏膜屏障的主要组织结构基础，而 UC 发生发展的主要机制是肠黏膜屏障功能丧失，导致细菌侵入并激发体内的一系列炎症反应，进一步引起溃疡及肉芽肿^[10]。PPAR-γ 是一类由配体激活的核转录因子，活化后可以调控多种细胞核内靶基因的表达，具有多种生物学效应，除具有调节脂肪代谢、细胞分化、炎症和免疫等作用外，PPAR-γ 还参与多种免疫性疾病的发生和发展，在肠道上皮组织优势表达。PPAR-γ 激活后，可通过与 NF-κB, AP-1, STATS 信号通路相互作用而调控靶基因转录，目前认为其主要通过抑制 NF-κB 的活化发挥其在 UC 中的抗炎作用^[11]。

用现代药学研究技术阐述“引经报使”理论，是方剂配伍规律研究的关键科学问题之一^[12-13]。作为常用祛风药，防风可引导药物到达病变部位，发挥

使药的作用^[14]。本研究通过加减防风用量,发现全方疗效明显优于缺或减防风方,尤其是促进溃疡面的愈合及炎症的缓解,促进 PPAR- γ 蛋白表达,初步提示防风可引导循行,为其作使药应用的科学内涵进行了初步的阐释。

[参考文献]

[1] 王新月,王建云. 溃疡性结肠炎中医药治疗的关键问题与优势对策[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2): 263-264.

[2] 张玲,张怡,文炷力. 祛风药治疗腹泻型肠胃易激综合征理论探讨及临证体会[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 363-364.

[3] 陈文华,黄国栋,方承康. 溃疡性结肠炎现代医学研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(7): 51-53.

[4] 陆玥琳,沈洪,张声生,等. 中医序贯疗法对溃疡性结肠炎维持缓解的疗效观察[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(2): 118-120.

[5] 张燕,欧阳钦,陈代云. PPAR- γ 在溃疡性结肠炎黏膜中的表达[J]. 中华消化内镜杂志, 2002, 19(2): 81-83.

[6] 朱向东,梅晓云,王燕. 痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 PPAR- γ 基因和蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 941-945.

[7] 滕超,许惠娟,刘慧慧,等. 痛泻要方及拆方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠组织水通道蛋白 3 表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(5): 290-294.

[8] 朱向东,梅晓云,吴红彦,等. 痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜细胞间黏附分子-1 mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 174-178.

[9] Ait-Belgnaoui A, Eutamene H, Houdeau E, et al. Lactobacillus farciminis treatment attenuates stress induced over-expression of c-fos protein in spinal and supraspinal sites after colorectal distension in rats[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(5): 567-571.

[10] Bellavia M, Tomasello G, Romeo M, et al. Gut microbiota imbalance and chaperoning system malfunction are central to ulcerative colitis pathogenesis and can be counteracted with specifically designed probiotics; a working hypothesis [J]. Med Microbiol Immunol, 2013, 202(6): 393-406.

[11] Duan S Z, Usher M G, Mortensen R M. PPARs; the vasculature, inflammation and hypertension [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009, 18(2): 128-133.

[12] 殷健,陈熙春. 从受点学说探讨中药“引经报使”[J]. 中医杂志, 2010, 51(2): 52-53.

[13] Zhao R Z, Liu U S J, Mao S R, et al. Using traditional Chinese medicine guide drug as a new drug delivery method for targeting: a hypothesis and proof [J]. Drug Metab Rev, 2009, 41(S2): 76-77.

[14] 梁丽娜,王志强,马纳,等. 防风对六味地黄丸干预实验性视网膜变性作用的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2013, 23(5): 313-317.

[责任编辑 聂淑琴]