

# 加味藿香正气软胶囊对 DSS 致小鼠结肠炎的作用及机制

孙兰, 宗绍波, 吕耀中, 周军, 毕宇安, 王振中\*, 萧伟\*

(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

**[摘要]** **目的:**研究加味藿香正气软胶囊(JWHX)对葡聚糖硫酸钠(DSS)致小鼠结肠炎模型的抗炎机制。**方法:**将 60 只 ICR 雄性小鼠随机分为正常组、模型组、JWHX 高、中、低剂量组(0.60, 0.30, 0.15 g·kg<sup>-1</sup>)。采用 35 g·L<sup>-1</sup> DSS 供小鼠自由饮用复制结肠炎模型,同时开始每天 ig 给药,连续 7 d。每天进行疾病活动指数(DAI)评分,7 d 后处死小鼠,对各组小鼠结肠进行组织病理学评分,检测结肠组织中髓过氧化物酶(MPO)含量及白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)促炎性细胞因子。**结果:**与正常组比较,模型组结肠炎小鼠 DAI 评分,病理学评分,MPO,IL-6,TNF-α 含量显著升高,小鼠结肠长度显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,JWHX 高、中剂量组可显著降低 DSS 结肠炎小鼠的 DAI 评分和病理学评分,升高小鼠结肠长度,显著降低结肠中 MPO,IL-6,TNF-α 含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );JWHX 低剂量组也能显著降低结肠炎小鼠的 DAI 评分,升高小鼠结肠长度,显著降低结肠中 MPO 含量( $P < 0.05$ )。**结论:**JWHX 对 DSS 致小鼠结肠炎具有一定治疗作用,其机制与抑制 IL-6, TNF-α 促炎性细胞因子产生相关。

**[关键词]** 加味藿香正气软胶囊; 葡聚糖硫酸钠; 结肠炎; 炎症因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0091-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130091

**Mechanism of Jiawei Huoxiang Zhengqi Soft Capsule in DSS-induced Colitis Model in Mice** SUN Lan, ZONG Shao-bo, LYU Yao-zhong, ZHOU Jun, BI Yu-an, WANG Zhen-zhong\*, XIAO Wei\* (*Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect and mechanism of anti-inflammation of Jiawei Huoxiang Zhengqi soft capsule (JWHX) on dextran sulphate sodium salt (DSS) induced colitis model in mice. **Method:** Sixty ICR male mice were randomly divided into normal group, model group, JWHX in high, middle and low dose (0.60, 0.30, 0.15 g·kg<sup>-1</sup>) groups. DSS 35 g·L<sup>-1</sup> was used to induce colitis model in mice, at the same time mice was given drug by intragastric administration for 7 days. The disease activity index (DAI) was scored daily. Mice was killed on the day 7, the histopathological score of each mouse colon was evaluated, the content of myeloperoxidase (MPO) in colonic tissue was measured. The levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α) were measured. **Result:** Compared with normal group, in the model group the DAI score and the pathological score increased significantly, and the content of MPO, IL-6, TNF-α increased significantly in the colon, and colon length decreased significantly in mice ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, high and middle dose JWHX could significantly decrease the DAI score and the pathological score, and significantly increased length of colon and reduce the content of MPO in the colon, IL-6, and TNF-α levels ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Low-dose JWHX could significantly reduce the DAI score, increased length of colon, and significantly reduce the content of MPO in the colon ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** JWHX has certain therapeutic effect on DSS-induced colitis in mice, and its mechanism may be related to the inhibition of the IL-6, TNF-α of inflammatory factor.

**[Key words]** Jiawei Huoxiang Zhengqi soft capsule; dextran sulphate sodium salt; colitis; inflammatory factor

**[收稿日期]** 20140726(004)

**[基金项目]** 国家国际科技合作专项(S2013ZR0541)

**[第一作者]** 孙兰,博士,副主任中药师,从事中药新药药效筛选与评价, Tel:0518-81152297, E-mail:sunlan2012@126.com

**[通讯作者]** \* 萧伟,博士,研究员级高级工程师,从事中药新药研究与开发, Tel:0518-81152337, E-mail:kanionlunwen@163.com;

\* 王振中,博士,高级工程师,从事中药新药研究与开发, E-mail:wzhzh-nj@163.net

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性非特异性炎症性肠病,其病程漫长,治愈难度大。目前,治疗 UC 常用的传统药物长期用药副作用大<sup>[1]</sup>,近年来使用的生物制剂价格昂贵,不利于广泛运用于临床,因此寻找不良反应小、经济的药物意义重大。加味藿香正气软胶囊(JWHX)是由藿香正气散改变剂型而来,组方源自宋代官方太医局主持编写的《太平惠民和剂局方》卷之二治伤寒。方由广藿香、紫苏叶、白术(炒)、陈皮、厚朴(姜制)、白芷、茯苓、大腹皮、半夏(制)、生姜、甘草、桔梗、大枣组成,具有解表化湿,理气和中功能。现代研究显示,藿香正气方具有解痉、止泻、调节细胞免疫功能和肠屏障功能保护等多方面作用<sup>[2-6]</sup>。本实验通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎模型,研究 JWHX 体内抗炎性肠病作用,并探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 加味藿香正气软胶囊[全方组成药味:广藿香 9 g,紫苏叶 9 g,白芷 9 g,炒白术 6 g,陈皮 6 g,半夏(制)6 g,姜厚朴 6 g,茯苓 9 g,桔梗 6 g,甘草 0.75 g,大腹皮 9 g,生姜 0.5 g,大枣 0.5 g],提取物(JWHX,批号 20130506,0.21 g 提取物/1 g 成品,江苏康缘药业股份有限公司),柳氮磺吡啶肠片(批号 20131116,上海信宜嘉华药业有限公司),硫酸葡聚糖[DSS,相对分子质量(Mr)为 36 000 ~ 50 000,硫磺含量为 18% ~ 20%,批号 20140123 美国 MP Biomedicals 公司,每天用蒸馏水新鲜配制成质量浓度 35 g·L<sup>-1</sup>溶液,供动物自由饮用],生理盐水(批号 2012011501,山东齐都药业有限公司),小鼠髓过氧化物酶(MPO)酶联免疫(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号 20140221),小鼠白介素(IL)-6 ELISA 检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号 20140315),小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA 检测试剂盒(eBioscience 公司,批号 20140128),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 20140316)。

**1.2 动物** ICR 小鼠,体重 20 ~ 22 g,雄性,扬州大学比较医学中心提供,合格证号 SCXK(苏)2012-0004。

**1.3 仪器** BS224S 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),5804R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),FlexStation 3 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

## 2 方法

**2.1 模型复制及给药** 动物适应饲养 3 d 后,将

小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药组(柳氮磺吡啶肠片,0.125 g·kg<sup>-1</sup>),JWHX 高、中、低剂量组(0.6,0.30,0.15 g·kg<sup>-1</sup>,相当于 4,2 倍及临床等效剂量,每组 10 只。正常组饮用蒸馏水,其余各组小鼠饮用 35 g·L<sup>-1</sup> DSS 溶液进行造模。造模同时给药,给药组分别按上述剂量 ig 给药,正常组和模型组 ig 给予质量浓度 5 g·L<sup>-1</sup> 羧甲基纤维素钠(CMC-Na),给药体积 20 mL·kg<sup>-1</sup>,每天各组动物称体重,观察大便性状,出血情况,连续 7 d。实验最后 1 d,脱颈椎处死动物,剖腹观察结肠外观,取肛门至回盲部段结肠,测量长度后,延系膜侧剖开结肠,生理盐水冲洗干净,取距肛门端 3 cm 左右结肠 4% 多聚甲醛固定,切片,HE 染色,进行组织病理学评分,其余结肠 -80 °C 保存待测 MPO 含量及 IL-6, TNF- $\alpha$  炎性细胞因子含量。

## 2.2 检测指标

**2.2.1 DAI 评分** 给予 DSS 第 1 ~ 7 天,记录小鼠体重、大便性状、便血情况,参考文献[7]进行评分。

**2.2.2 结肠长度及组织病理学检测** 脱颈椎处死动物,剖腹观察结肠外观,取肛门至回盲部段结肠,测量长度。取小鼠部分结肠用 4% 多聚甲醛溶液固定,常规取材,脱水,石蜡包埋。切片经 HE 染色,光学显微镜下观察,结肠黏膜受损的范围、程度及炎细胞浸润的情况,参考文献评判标准<sup>[7]</sup>,进行组织病理学评分。

**2.2.3 结肠 MPO, IL-6, TNF- $\alpha$  含量** 取小鼠结肠组织,用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS(pH 7.4, 含 2% 蛋白酶抑制剂,1% Triton X-100 和 0.1% 二硫苏糖醇),在冰浴下制成 10% 组织匀浆,4 °C,3 500 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,取上清保存于 -80 °C 冰箱,待检测 MPO, IL-6, TNF- $\alpha$  含量。

**2.3 结果处理和分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,组间比较采用方差分析。结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 DAI 评分的影响** 正常组动物在试验期间体重、粪便性状均正常,未见便血,一般状态良好;给予 35 g·L<sup>-1</sup> DSS 各组在第 4 天出现大便松散、体重减轻,其中模型组大部分动物出现便血。与正常组比较,模型组动物 DAI 在饮用 35 g·L<sup>-1</sup> DSS 第 4 ~ 7 天均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,阳性药组在给药 4 ~ 7 d DAI 均显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),JWHX 提取物高、中剂量组在第 4 ~ 7 天 DAI 显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),JWHX 提取物

低剂量组在第 5,6 天 DAI 显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 加味藿香正气软胶囊对 DSS 致小鼠肠炎 DAI 评分影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of JWXX on DAI score in mice with DSS-induced colitis ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	DAI 评分/分			
		第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
正常	-	0	0	0	0
模型	-	3.30 ± 0.95 <sup>1)</sup>	3.70 ± 0.95 <sup>1)</sup>	4.70 ± 1.16 <sup>1)</sup>	5.11 ± 1.96 <sup>1)</sup>
柳氮磺嘧啶肠片	0.125	0.60 ± 0.97 <sup>3)</sup>	2.33 ± 1.58 <sup>2)</sup>	2.00 ± 1.73 <sup>3)</sup>	2.33 ± 1.32 <sup>3)</sup>
JWXX	0.60	0.70 ± 0.95 <sup>3)</sup>	1.00 ± 1.63 <sup>3)</sup>	2.60 ± 1.84 <sup>3)</sup>	3.00 ± 1.41 <sup>2)</sup>
	0.30	1.44 ± 1.24 <sup>3)</sup>	1.90 ± 1.45 <sup>3)</sup>	3.50 ± 0.97 <sup>2)</sup>	3.22 ± 1.56 <sup>2)</sup>
	0.15	2.10 ± 1.85	2.10 ± 1.66 <sup>2)</sup>	3.10 ± 1.20 <sup>3)</sup>	3.50 ± 1.72

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

**3.2 对结肠长度及肠组织病理评分的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肠长度显著缩短 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,JWXX 提取物高、中、低剂量组及阳性药组小鼠结肠长度显著变长 ( $P < 0.05$ )。模型组病变累及黏膜层和黏膜下层,炎细胞类型主要为中性粒细胞和单核巨噬细胞,隐窝坏死,严重者表面上皮缺失,形成溃疡。JWXX 提取物高、中剂量组有减轻慢性结肠炎的作用,与模型组比较有统计学显著性差异 ( $P < 0.05$ )。见表 2,图 1。

表 2 加味藿香正气软胶囊对 DSS 致小鼠肠炎结肠长度及肠组织病理评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of JWXX on colon length and pathological score in mice with DSS-induced colitis ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	结肠长度/ $\text{cm}$	肠组织病理评分/分
正常	-	10.55 ± 1.09	0
模型	-	7.38 ± 0.91 <sup>1)</sup>	7.00 ± 1.80 <sup>1)</sup>
柳氮磺嘧啶肠片	0.125	8.37 ± 0.76 <sup>2)</sup>	3.89 ± 2.52 <sup>3)</sup>
JWXX	0.60	8.71 ± 1.16 <sup>2)</sup>	3.85 ± 3.54 <sup>2)</sup>
	0.30	8.71 ± 1.15 <sup>2)</sup>	4.22 ± 2.73 <sup>2)</sup>
	0.15	8.75 ± 1.03 <sup>2)</sup>	5.40 ± 3.17

**3.3 对肠组织 MPO, TNF- $\alpha$ , IL-6 含量的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肠组织 MPO 含量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,JWXX 提取物高、中、低 3 个剂量组小鼠肠组织 MPO 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。与正常组比较,模型组小鼠肠组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 含量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,JWXX 提取物高、中剂量组小鼠肠组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

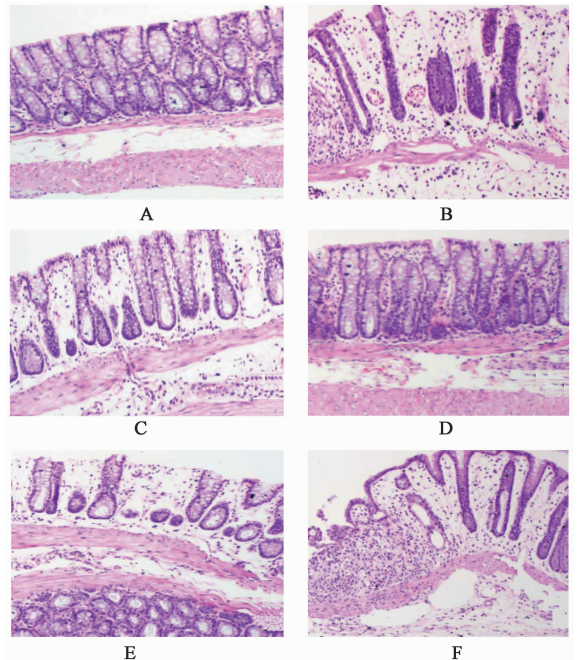


图 1 加味藿香正气软胶囊对 DSS 致小鼠肠炎肠组织病理评分的影响 (HE,  $\times 100$ )

Fig. 1 Effects of JWXX on colon pathology in mice with DSS-induced colitis (HE,  $\times 100$ )

#### 4 结论

溃疡性结肠炎病变多累及直肠和远端结肠,结肠黏膜出现弥漫性炎性细胞浸润,伴有多发性溃疡形成,有资料表明 DSS 结肠炎模型以结肠的水肿,缩短为特征,结肠长度的缩短在一定程度上可以作为反映炎症严重程度的一个指标<sup>[8]</sup>。给予小鼠饮用不同浓度和不同周期的 DSS 水溶液处理后可以建立急性、慢性和急慢性交替 UC 模型,其临床和病

表 3 加味藿香正气软胶囊对 DSS 小鼠肠炎肠组织 MPO, TNF- $\alpha$ , IL-6 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effects of JWHX on the content of MPO, IL-6, TNF- $\alpha$  in colon in mice with DSS-induced colitis ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	MPO /μg·g <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ /ng·g <sup>-1</sup>	IL-6 /ng·g <sup>-1</sup>
正常	-	0.41 ± 0.17	8.67 ± 1.71	1.60 ± 0.46
模型	-	0.91 ± 0.28 <sup>1)</sup>	23.08 ± 6.88 <sup>1)</sup>	4.24 ± 1.22 <sup>1)</sup>
柳氮磺吡啶肠片	0.125	0.65 ± 0.20 <sup>2)</sup>	17.89 ± 3.67	2.80 ± 0.82 <sup>2)</sup>
JWHX	0.60	0.50 ± 0.29 <sup>2)</sup>	15.17 ± 3.61 <sup>2)</sup>	2.69 ± 0.88 <sup>2)</sup>
	0.30	0.62 ± 0.22 <sup>2)</sup>	17.22 ± 4.55 <sup>2)</sup>	2.64 ± 0.96 <sup>2)</sup>
	0.15	0.63 ± 0.27 <sup>2)</sup>	17.36 ± 5.39	3.21 ± 1.19

理表现与人类 UC 极为相似,是目前最为理想的 UC 模型<sup>[9-10]</sup>,被广泛用于研究人类 UC 致炎机制和抗炎药物的筛选。

肠道炎症的启动在很大程度上可能与促炎性细胞因子的大量产生有关,在活动性 UC 的病变部位,IL-6, TNF- $\alpha$  及其他细胞因子如 IL-8 等均可增高<sup>[11]</sup>,且与病变活动性有关。研究发现,UC 患者致炎细胞因子 TNF- $\alpha$ , IL- $\alpha$ , IL-8 明显升高<sup>[12-13]</sup>。MPO 是由中性粒细胞、单核细胞和某些组织的巨噬细胞分泌的含血红素辅基的血红素蛋白酶,其含量的变化可以反映中性粒细胞在组织中的变化,间接代表炎症在组织中的存在。因此,检测 MPO 的水平可以衡量组织炎症的程度<sup>[14]</sup>。

本研究显示,模型组各动物均出现不同程度的大便松软或腹泻、血便和体重减轻,病理结果显示结肠下段糜烂或溃疡伴黏膜和黏膜下显著的炎症细胞浸润、部分有隐窝炎。其 DAI 评分、病理评分均显著升高,结肠长度显著变短,模型组小鼠结肠中 MPO 含量及 IL-6, TNF- $\alpha$  等促炎性细胞因子水平均比正常对照组显著升高,说明已成功复制了小鼠结肠炎模型,类似人类 UC,与文献报道相符<sup>[15]</sup>。JWHX 可明显减轻动物的消化道症状和结肠黏膜病理损伤,显著降低小鼠结肠中 MPO 含量, IL-6 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子的水平。提示 JWHX 提取物可能抑制肠道中促炎性细胞因子的产生,来降低 DSS 模型动物体内炎症反应,进而使病情得到缓解。

[参考文献]

[1] 夏冰,程虹. 溃疡性结肠炎的生物治疗[J]. 临床消化病杂志,2007,19(1):16-19.

[2] 袁晔蓉. 藿香正气水对大鼠胃肠道影响的研究[J]. 实用医技杂志,2007,9(5):177-178.

[3] 卿玉玲,孙克宏,郑飞鸣,等. 藿香正气液治疗胃肠型感冒临床观察[J]. 重庆医学,2006,35(6):548-548.

[4] 何颖辉,罗晓健,钱星文,等. 藿香正气胶囊对菌群失调小鼠黏膜免疫的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(22):2397-2400.

[5] 李丹,吕妍,唐方. 藿香正气提取物对腹泻型肠易激综合征大鼠免疫功能的调节作用[J]. 中草药,2009,40(3):440-442.

[6] 谢肆聪,唐方. 藿香正气软胶囊对肠屏障功能保护作用的机理研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(5):456-458.

[7] Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, et al. Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis [J]. Gastroenterology, 2002, 122(5):1428-1441.

[8] Egger B, Procaccino F, Lakshmanan J, et al. Mice lacking transforming growth factor- $\alpha$  have an increased susceptibility to dextran sulfate-induced colitis [J]. Gastroenterology, 1997, 113(3):825-832.

[9] Ni J, Chen S F, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes [J]. Gut, 1996, 39(2):234-241.

[10] 赵平,董蕾,罗金燕,等. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎小鼠模型的建立[J]. 第四军医大学学报,2005,26(19):1738-1740.

[11] 余小华,李刚,杜兴邦,等. 溃疡性结肠炎发病时组织及血清中 IL-8 水平的变化[J]. 放射免疫学杂志,2004,17(4):274-275.

[12] Guimbaud R, Bertrand V, Chauvelot-Moachon L, et al. Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis [J]. Am J Gastroenterol, 1998,93(12):2397-2404.

[13] Arai F, Takahashi T, Furukawa K, et al. Mucosal expression of interleukin-6 and interleukin-8 messenger RNA in ulcerative colitis and in Crohn's disease [J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(9):2071-2079.

[14] He J, Liang J, Zhu S, et al. Anti-inflammatory effects of Pulvis Fellis Suis extract in mice with ulcerative colitis [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1):53-59.

[15] 刘敬军,郑长青,潘丽丽,等. BALB/C 小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(14):1776-1778.

[责任编辑 聂淑琴]