

四神丸和葛根芩连片对 DSS 诱导的小鼠实验性结肠炎的作用比较

王旭丹, 葛东宇, 李根茂, 邱泽计, 吴珺, 郝钰*

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

[摘要] **目的:**比较四神丸和葛根芩连片对硫酸葡聚糖钠(DSS)诱导的小鼠急性和慢性结肠炎的治疗作用。**方法:**急性或慢性结肠炎实验中 C57BL/6J 小鼠均随机分为 4 组,即正常组,DSS 急性或慢性模型组,四神丸组($2.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),葛根芩连片组($6.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。4% DSS 连续给小鼠自由饮用 5 d 制备急性结肠炎模型;3% DSS 给小鼠 4 次循环饮用(1~5 d,8~12 d,15~19 d,22~26 d)制备慢性结肠炎模型。急性模型于 DSS 饮水次日开始给药,连续 ig 给药 8 d;慢性模型于 DSS 饮水 2 次循环后开始给药,连续给药 16 d。分别测定小鼠疾病活动度指数(DAI)和结肠组织中髓过氧化物酶(MPO)活性,HE 染色观察结肠组织学变化。**结果:**与正常组比较,模型组急性结肠炎与慢性结肠炎小鼠 DAI 均明显升高,结肠组织炎症损伤较为明显,MPO 活性明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);急性结肠炎中葛根芩连片从第 5 天开始、四神丸从第 7 天开始显著改善小鼠 DAI ($P < 0.05$),二者均能显著减轻小鼠结肠组织炎症损伤($P < 0.01$, $P < 0.05$),并降低结肠组织中 MPO 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$);慢性结肠炎中四神丸从第 18 至 22 天及 24 天可显著改善模型小鼠的 DAI($P < 0.05$),并能减轻结肠组织炎症损伤($P < 0.05$),葛根芩连片对慢性结肠炎小鼠各指标均无显著性改善。**结论:**四神丸对 DSS 诱导的急性及慢性结肠炎均有显著改善作用,葛根芩连片仅对急性结肠炎有显著疗效。

[关键词] 四神丸;葛根芩连片;结肠炎;硫酸葡聚糖钠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0142-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150142

Comparison on Effects of Sishen Pills and Gegen Qinlian Tablets on DSS-induced Experimental Colitis in

Mice WANG Xu-dan, GE Dong-yu, LI Gen-mao, QIU Ze-ji, WU Jun, HAO Yu* (School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of Sishen pills and Gegen Qinlian tablets in treating acute or chronic colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in mice. **Method:** In the acute or chronic colitis experiment, C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: the normal group, the DSS acute or chronic model group, the Sishen pills group ($2.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) or Gegen Qinlian tablets group ($6.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The acute colitis model was established by free drinking of 4% DSS for five days, while the chronic colitis model was established by circulating drinking of 3% DSS (1-5, 8-12, 15-19 d and 22-26 d). The acute model was orally given drugs on the second day after drinking DSS for 8 d, while the chronic model was given drugs after the second circulating drinking for 16 d. The disease activity index (DAI) and myeloperoxidase (MPO) in colonic tissues were respectively determined, and the changes in colonic tissue were detected by HE staining. **Result:** Compared with the normal group, both acute colitis and chronic colitis groups showed significant higher DAI and MPO and notable inflammatory damages in colonic tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the acute DSS model, Gegen Qinlian tablets had an effect on reducing DAI since the 5th day, while Sishen pills significantly reduced DAI since the 7th day ($P < 0.05$), both can significantly relieve inflammatory damages in colonic tissues ($P < 0.01$, $P < 0.05$) and reduce MPO activity in colonic tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the chronic DSS model, Sishen pills significantly

[收稿日期] 20140912(006)

[基金项目] 北京中医药大学科研基金项目(2013-JYBZZ-JS-119)

[第一作者] 王旭丹,博士,从事中医药免疫调节研究,Tel:010-64286972,E-mail:wangxd@bucm.edu.cn

[通讯作者] *郝钰,教授,从事中医药免疫调节研究,Tel:010-64286972,E-mail:yuhao64@sina.com

reduced DAI since the 18th and 24th day ($P < 0.05$) and relieve inflammatory damages in colonic tissues ($P < 0.05$), while Gegen Qinlian tablets had no significant change in all indexes of rats with chronic colitis. **Conclusion:** Sishen pills shows a remarkable effect in ameliorating acute colitis and chronic colitis induced by DSS, while Gegen Qinlian tablets can only ameliorate acute colitis.

[**Key words**] Sishen pills; Gegen Qinlian tablets; colitis; dextran sulfate sodium

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种常见的慢性胃肠道疾病,主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗氏病(Crohn's disease, CD)。本病以肠道炎症和黏膜组织损伤为特征,其病理机制与肠道黏膜免疫反应异常有着密切的关系^[1]。近年来我国IBD发病率呈上升趋势,该病慢性复发、迁延不愈,造成了患者的痛苦,本病也是发生大肠直肠癌的主要风险因子。炎症性肠病在中医学中属于“泄泻”、“腹痛”、“积聚”等范畴,临床辨证可分为多种证型,有报道认为结肠炎早期多为大肠湿热证,而后期多表现为脾肾阳虚证^[2]。大肠湿热证宜清热利湿、行气导滞,可用葛根苓连汤加减;脾肾阳虚证宜健脾补肾、温阳化湿,方用四神丸加味。相关文献也报道了四神丸与葛根苓连汤对实验性结肠炎有较好的改善作用^[3-4]。硫酸葡聚糖钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的小鼠结肠炎是研究IBD常用的动物模型,并能建立出急性和慢性结肠炎的模型,笔者推测急性模型可能主要表现为大肠湿热,而慢性模型主要呈现脾肾阳虚。因此,本文通过建立DSS诱导的小鼠急性及慢性结肠炎模型对中成药四神丸及葛根苓连片的疗效作用进行比较,从而明确是否葛根苓连片对急性DSS模型有效,而四神丸对慢性DSS结肠炎有效。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6J小鼠,雌性,18~22 g, SPF级,北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2009-0007。

1.2 药物及试剂 四神丸(北京同仁堂天然药物有限公司,批号13080010),葛根苓连片(太极集团四川绵阳制药有限公司,批号12120007),DSS(美国Sigma公司,批号SLBB4215V),髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(批号20130920),隐血试剂盒(批号20131012)均为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 仪器 1516型切片机(德国Leitz公司),BX40型光学显微镜(日本Olympus公司),E320型显微照相机(日本Olympus公司),5417R型离心机(德国Eppendorf公司),721型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

2 方法

2.1 DSS诱导小鼠实验性结肠炎 DSS诱导的急性结肠炎模型参考文献[5],DSS用蒸馏水配制成4%的溶液,令小鼠自由饮用,连续5 d。DSS诱导的慢性结肠炎模型参考文献[6],DSS用蒸馏水配制成3%的溶液,令小鼠自由饮用,时间为1~5 d,8~12 d,15~19 d,22~26 d,共循环4次,2次循环之间的时间予蒸馏水饮用。

2.2 分组与给药 DSS急性结肠炎实验:小鼠随机分为4组,即正常组、DSS模型组、四神丸组(2.25 g·kg⁻¹,相当于临床人用量的10倍)、葛根苓连片组(6.5 g·kg⁻¹,相当于临床人用量的10倍)。每组10只。开始给予DSS后次日开始给药,连续给药8 d,第10天处死小鼠进行指标测定。DSS慢性结肠炎实验:小鼠随机分组同上。DSS饮水2次循环后开始给药(即实验开始后第12天),持续给药16 d,给药后第17天处死小鼠后进行指标测定。

2.3 小鼠结肠炎症状及疾病活动度指数(disease activity index, DAI)评分 造模后每天观察动物一般状况、体重、测定大便隐血分数,参考文献[7]进行DAI评分。DAI由体重减失率分数和大便隐血分数相加而得。评分标准:①体重减失率评分:体重无减轻,0分;减轻5%~9%,1分;减轻10%~14%,2分;减轻15%~20%,3分;减轻大于20%,4分。②大便隐血评分:隐血阴性(-),0分;隐血弱阳性(+),1分;隐血阳性(++),2分;隐血强阳性(+++),3分;肉眼可见血便,4分。两者分数相加即为DAI分值。

2.4 小鼠结肠组织学观察 分离小鼠结肠,取约1 cm长,10%中性福尔马林固定后,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察组织学变化。DSS急性结肠炎评分参考文献[8],分为上皮损伤及黏膜炎细胞浸润2个方面。上皮损伤:0,无损伤;1,杯状细胞少量丢失;2,杯状细胞大量丢失;3,少量隐窝消失;4,大量隐窝消失。炎症浸润:0,无浸润;1,浸润到隐窝底部;2,浸润到黏膜肌层;3,黏膜肌层大量浸润伴水肿;4,浸润到黏膜下层。以上两部分之和为组织学得分。DSS慢性结肠炎评分参考文献[6]从5个方面评分。炎症:0,无;1,温和;2,中度;3,严重。损伤

程度:0,无;1,黏膜;2,黏膜下;3,透壁性。再生:0,完全再生;1,几乎完全再生;2,隐窝未修复;3,上皮未修复;4,无修复。隐窝损伤:0,无损伤;1,损伤1/3;2,损伤2/3;3,仅表面上皮未损伤;4,隐窝和上皮均损伤。累积范围:1,1%~25%;2,26%~50%;3,51%~75%;4,76%~100%。以上5部分之和为组织学得分。

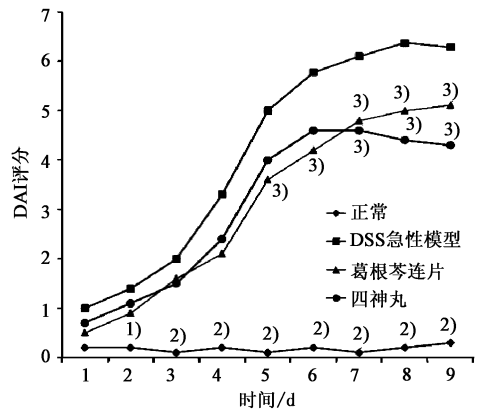
2.5 MPO 含量测定 动物处死后,每组取 8 只小鼠结肠中下段约 2 cm 长称重后匀浆,按试剂盒说明书进行测定。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件数据分析,所有数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DSS 急性结肠炎小鼠一般状况及 DAI 评分的影响 DSS 急性模型小鼠在给予 DSS 饮用 2 d 后,各组动物普遍出现稀便、体重减轻、倦怠萎靡、竖毛。至第 5 天,部分动物出现明显血便。模型组消瘦明显,四神丸组及葛根芩连片组动物状态相对较好。从造模开始后的 4 d 开始,DSS 急性模型组体重降低百分率显著低于正常组。葛根芩连片和四神丸均有助于模型小鼠的体重恢复,四神丸组第 8,9 天,葛根芩连片组第 8 天均与模型组有显著差异 ($P < 0.05$)。从造模第 2 天开始,DSS 模型组 DAI 指数与正常组比较即有显著增加,并持续至实验结束 ($P < 0.01$)。葛根芩连片能较快地改善 DSS 小鼠的 DAI,实验第 5 天开始直至实验结束,其 DAI 较模型组显著降低 ($P < 0.05$),而四神丸则在实验第 7 天开始改善 DAI 并直至实验结束 ($P < 0.05$)。四神丸对 DAI 的改善作用略好于葛根芩连片,但二者之间无统计学差异。见图 1。

3.2 对 DSS 慢性结肠炎小鼠一般状况及 DAI 评分的影响 DSS 慢性模型小鼠主要的临床表现与 DSS 急性模型小鼠相似,但体重衰减较为缓和,大约 2 轮循环后,小鼠体重下降到最低,此后体重逐渐恢复,实验结束时,模型动物体重已基本恢复到实验开始前的水平,慢性 DSS 模型动物的体重衰减情况在造模后第 3 天至实验结束期间均与正常组有显著降低。四神丸给药后,小鼠体重恢复较快,至 24 d 开始到 28 d 均与明显恢复 ($P < 0.05$)。葛根芩连片也有促进体重恢复趋势,但与模型组比较无显著差异。在第 2 轮饮用 DSS 循环后期,开始有小鼠死亡,动物的死亡情况至第 3 轮 DSS 循环后停止,第 4 轮 DSS 循环中未出现小鼠死亡,整个病程中 DSS 模型



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 DSS 急性模型组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

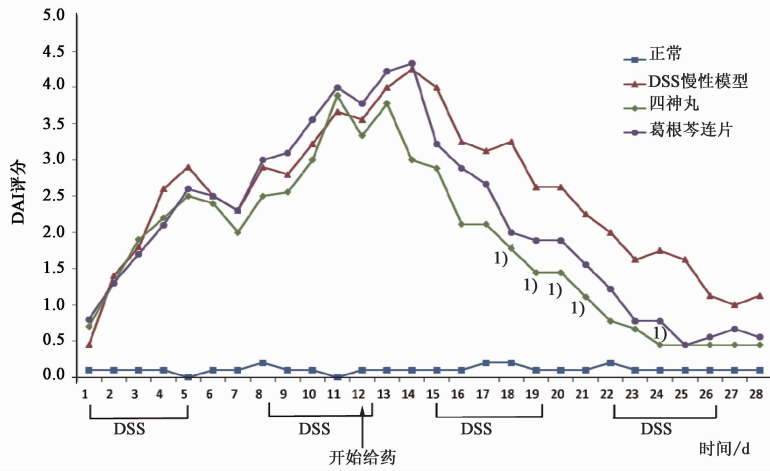
图 1 四神丸和葛根芩连片对 DSS 诱导的急性结肠炎小鼠 DAI 指数的影响

Fig. 1 Effects of DAI scores of Sishen pill and Gegen Qinlian tablets on acute colitis induced by DSS in mice

组小鼠死亡 2 只,葛根芩连组及四神丸组动物各死亡 1 只。从造模第 2 天开始,DSS 模型组 DAI 指数显著升高,并持续至实验结束 ($P < 0.01$)。四神丸给药一段时间后能显著降低 DAI 评分,实验第 18~22,24 天与模型组比较有显著性差异,其后因模型组动物的 DAI 逐渐恢复,两组之间则无显著性差异。葛根芩连片对 DSS 慢性结肠炎的 DAI 有一定的改善趋势,但无显著性差异。见图 2。

3.3 四神丸及葛根芩连片对 DSS 急性和慢性结肠炎结肠组织学变化的影响 组织学显示正常组小鼠结肠上皮完整,结构清晰,固有层有少量淋巴细胞,杯状细胞丰富,腺管结构。DSS 急性模型小鼠结肠上皮大量破损、脱落,杯状细胞丢失,大量炎性细胞浸润;有较大溃疡,腺管破坏消失,多处隐窝脓肿。DSS 慢性结肠炎模型则显示有严重的隐窝炎症、单核淋巴细胞浸润,隐窝底部与黏膜肌层宽度增加,淋巴细胞浸润到黏膜肌层下,甚至形成透壁性浸润,部分小鼠开始出现腺管再生。急性 DSS 模型和慢性 DSS 组织学评分显著升高 ($P < 0.01$)。经四神丸和葛根芩连汤治疗后,DSS 急性结肠炎的组织学损伤得到明显缓解 ($P < 0.01, P < 0.05$)。在 DSS 慢性结肠炎实验中,四神丸对慢性 DSS 结肠炎的组织学损伤也有明显改善作用 ($P < 0.05$),葛根芩连片有一定程度的改善趋势,但无统计学差异。无论是 DSS 急性模型还是慢性模型实验,四神丸组与葛根芩连组之间无显著差异,但评分数值上四神丸略优于葛根芩连片。见图 3,表 1。

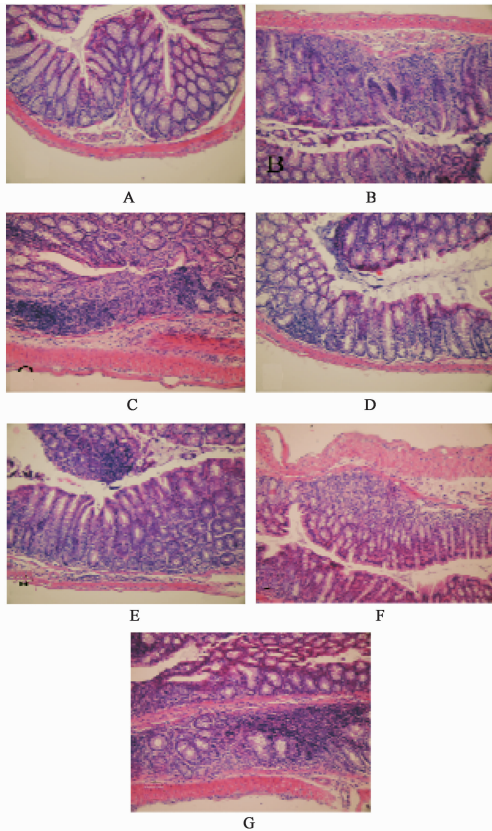
3.4 四神丸及葛根芩连片对 DSS 急性和慢性结肠



与 DSS 慢性模型组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 2 四神丸和葛根芩连片对 DSS 诱导的慢性结肠炎小鼠 DAI 指数的影响

Fig. 2 Effects of DAI scores of Sishen pill and Gegen Qinlian tablets on chronic colitis induced by DSS in mice



A. 正常组; B. DSS 急性模型组; C. DSS 慢性模型组; D. DSS 急性模型 + 四神丸组; E. DSS 急性模型 + 葛根芩连片组; F. DSS 慢性模型 + 四神丸组; G. DSS 慢性模型 + 葛根芩连片组

图 3 四神丸和葛根芩连片对 DSS 诱导的小鼠结肠炎结肠组织学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 3 Effects of Sishen pill and Gegen Qinlian tablets on acute or chronic colitis by DSS in mice (HE, $\times 200$)

炎结肠组织 MPO 活力的影响 急性 DSS 模型结肠组织中 MPO 活性较正常组显著增强, 四神丸与葛根

表 1 四神丸和葛根芩连片对 DSS 诱导的小鼠结肠炎结肠组织学评分 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Histological scores of Sishen pill and Gegen Qinlian tablets on acute or chronic colitis induced by DSS in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	组织学评分	
		DSS 急性模型	DSS 慢性模型
正常	-	0.25 ± 0.43	0.38 ± 0.70
DSS 模型	-	6.00 ± 1.00 ¹⁾	12.25 ± 2.05 ¹⁾
四神丸	2.25	4.13 ± 1.17 ³⁾	9.13 ± 2.71 ²⁾
葛根芩连片	6.5	4.63 ± 1.11 ²⁾	10.63 ± 1.11

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 DSS 急性/慢性模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

芩连片均则能抑制结肠组织中 MPO 的活性, 但二者之间无显著差异。慢性 DSS 模型小鼠结肠组织 MPO 活性也显著增强但不如急性模型显著, 四神丸及葛根芩连片对慢性炎症中 MPO 活性的抑制作用并不明显, 与模型组比较无显著差异。见表 2。

4 讨论

DSS 诱导的实验性结肠炎是研究炎症性肠病的常用的化学诱导模型。DSS 对结肠黏膜上皮有直接毒性并激发炎症, 临床特征有体重减轻、腹泻、肠出血和死亡; 组织学分析显示广泛的隐窝和上皮细胞损伤、中性粒细胞和巨噬细胞的浸润、组织水肿和溃疡; 慢性 DSS 诱导的结肠炎可见淋巴细胞大量增加, 透壁性炎症等组织学改变^[9]。

炎症性肠病的中医机制为湿邪内蕴, 气血壅滞, 脾肾亏虚。湿邪内蕴为其标实, 脾肾亏虚为其本虚。临床上以大肠湿热证和脾肾阳虚证较多见^[10], 结肠

表 2 四神丸和葛根芩连片对 DSS 诱导的结肠炎小鼠结肠中 MPO 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of MPO activity of Sishen pill and Gegen Qinlian pellet on acute or chronic colitis induced by DSS in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MPO/U·g ⁻¹	
		DSS 急性模型	DSS 慢性模型
正常	-	0.81 ± 0.22	0.79 ± 0.20
DSS 模型	-	1.91 ± 0.41 ¹⁾	1.20 ± 0.37 ²⁾
四神丸	2.25	1.05 ± 0.40 ⁴⁾	0.90 ± 0.20
葛根芩连片	6.5	1.19 ± 0.74 ³⁾	1.02 ± 0.32

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01;与 DSS 急性/慢性模型组比较³⁾P < 0.05,⁴⁾P < 0.01。

炎早期多为大肠湿热证,而后期多表现为脾肾阳虚证。治疗上大肠湿热证可用葛根芩连汤加减;脾肾阳虚证可用四神丸加味。结合中医对炎症性肠病的认识,本实验采用 DSS 诱导小鼠急、慢性实验性结肠炎比较葛根芩连片与四神丸对这两种小鼠结肠炎治疗作用的差异。

结果显示,葛根芩连片和四神丸均能在给药一段时间后有效改善急性 DSS 结肠炎的 DAI,葛根芩连片较四神丸起效快,但四神丸开始发挥作用后的改善作用更加明显。而在 DSS 慢性结肠炎中,四神丸在给药一段时间后能显著改善模型小鼠的 DAI,实验后期,因模型小鼠 DAI 逐渐降低以致四神丸的改善作用变得不明显;葛根芩连片在给药期间对小鼠 DAI 虽有一定的缓解趋势,但始终与模型组无显著性差异。组织学显示急性 DSS 模型小鼠结肠正常结构破坏,上皮大量破损、脱落,有较大溃疡,腺管破坏消失,杯状细胞丢失,多处隐窝脓肿出现;经四神丸和葛根芩连汤治疗后,结肠组织学损伤得到缓解,二者之间无显著差异。慢性 DSS 结肠炎小鼠结肠则显示有严重的隐窝炎症,隐窝底部与黏膜肌层宽度增加,淋巴细胞浸润到黏膜肌层下,甚至形成透壁性浸润。四神丸对慢性 DSS 炎症也有一定的缓解作用,葛根芩连片的缓解作用并不明显。

MPO 是中性粒细胞的特征性酶,组织中的 MPO 活力代表了中性粒细胞的浸润程度,因而与炎症密切相关。DSS 急性模型结肠组织中 MPO 活性显著增强,四神丸与葛根芩连汤均能抑制结肠组织中 MPO 的活性。葛根芩连汤略好于四神丸,但二者之间无显著差异。DSS 慢性模型小鼠结肠组织 MPO 活性也显著增强但不如急性模型显著,表明慢性模型中中性粒细胞浸润程度有所下降。四神丸和葛根

芩连片对慢性炎症中 MPO 活性无明显抑制作用。

综上所述,四神丸对 DSS 诱导的急性和慢性结肠炎均有显著治疗作用,葛根芩连片仅对急性结肠炎有显著疗效,但对急性 DSS 结肠炎的 DAI 改善作用出现较早。葛根芩连片对 DSS 急性结肠炎有效、四神丸对 DSS 慢性结肠炎有效可以反映出急性结肠炎存在大肠湿热证而慢性结肠炎存在脾肾阳虚证的现象。然而,四神丸对急性结肠炎同样也有效则表明急性结肠炎中不仅有大肠湿热,同时也存在脾肾阳虚的表现。

[参考文献]

- [1] Kaser A, Zeissig S, Blumberg R. Inflammatory Bowel disease[J]. Annu Rev Immunol, 2010,28:573-621.
- [2] 马亦旻,赵智强.溃疡性结肠炎的中医治疗研究进展[J]. 中医药学报,2012,40(4):138-140.
- [3] 赵海梅,刘端勇,汤菲,等.四神丸对小鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜修复的保护性机制研究[J]. 中成药, 2009,31(12):1935-1937.
- [4] 赵益,李冰涛,赖小东,等.葛根芩连汤复方剂量变化治疗溃疡性结肠炎的量-效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):131-134.
- [5] Hasan Zaki, Kelli Boyd, Pete Vogel, et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis[J]. Immunity, 2010,32(3):379-391.
- [6] Hidetoshi Takedatsu, Kathrin S Michelsen, Bo Wei, et al. TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper1 and T-helper17 activation [J]. Gastroenterology, 2008, 135(2):552-567.
- [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] Alex P, Zachos N C, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2009,15(3):341-352.
- [9] Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and Tricks [J]. J Biomed Biotechnol,2012,2012(5):e718617.
- [10] 张喆,王微,高敏,等.中药辨证治疗慢性溃疡性结肠炎 43 例临床观察[J]. 北京中医药, 2011,30(11): 836-838.

[责任编辑 周冰冰]