

痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠 下丘脑中 IL-6, IL-6R 表达的影响

李婷, 朱向东*, 杨意, 翟艳会
(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**观察痛泻要方对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠下丘脑中白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-6受体(IL-6R)基因和蛋白表达的影响。**方法:**将 SPF 级 Wistar 大鼠运用复合方法进行溃疡性结肠炎造模后,随机分为 5 组:模型组,痛泻要方低、中、高剂量(2.75, 5.5, 11 g·kg⁻¹)组,美沙拉嗪(5-ASA)组。药物处理大鼠 21 d 后麻醉处死,肉眼观察结肠大体形态损伤并进行评分。分离各组大鼠血清,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中 IL-6 含量,分离大鼠下丘脑组织并提取总 RNA 后,实时荧光定量 PCR(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)法检测 IL-6 和 IL-6R 基因表达,免疫组织化学染色法检测下丘脑组织 IL-6 和 IL-6R 的分布及蛋白表达量。**结果:**ELISA 结果显示,与空白组比较,模型组大鼠血清中 IL-6 含量明显升高,经过药物处理后,药物组血清中 IL-6 含量均有所下降,其中以痛泻要方高剂量组效果最为明显($P < 0.05$)。Real-time PCR 结果表明,模型组大鼠下丘脑组织中 IL-6 和 IL-6R 基因表达量明显高于空白组($P < 0.05$),经药物治疗后,药物组 IL-6 和 IL-6R 基因表达均有所降低,其中以 5-ASA 组和痛泻要方高剂量组降低最为明显($P < 0.05$)。免疫组织化学染色结果表明,与空白组比较,溃疡性结肠炎大鼠 IL-6 和 IL-6R 蛋白表达量明显增加($P < 0.05$),药物处理可以降低大鼠下丘脑 IL-6 和 IL-6R 蛋白表达量,其中以 5-ASA 组和痛泻要方高剂量组降低最为明显($P < 0.05$)。**结论:**痛泻要方对 2,4,6 三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)/乙醇法 UC 大鼠下丘脑组织中 IL-6 和 IL-6R 基因和蛋白的表达具有明显抑制作用,提示痛泻要方治疗溃疡性结肠炎的机制可能与抑制下丘脑中 IL-6/IL-6R 信号通路的异常活化有关。

[关键词] 痛泻要方; 溃疡性结肠炎; 白细胞介素-6 (IL-6); 白细胞介素-6 受体 (IL-6R); 基因表达; 蛋白表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0103-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110103

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0942.024.html>

[网络出版时间] 2017-02-15 9:42

Effect of Tongxie Yaofang on IL-6, IL-6R mRNA and Protein Expressions of Hypothalamus Tissues in Rats with Experimental Ulcerative Colitis

LI Ting, ZHU Xiang-dong*, YANG Yi, ZHAI Yan-hui
(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the curative effect of Tongxie Yaofang on ulcerative colitis (UC) in rat hypothalamus cytokine interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptors (IL-6R) gene and protein expressions. **Method:** After the ulcerative colitis model was established by the composite method. SPF Wistar rats were randomly divided into 5 groups: model group, low, middle, high-dose Tongxie Yaofang groups (2.75, 5.5, 11 g·kg⁻¹), and 5-ASA group. After modeling, rats were given drugs for 21 days. Then, colonic mucosa damage was observed. The levels of IL-6 in the serum tissues were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The proteins expressions of IL-6 and IL-6R in rat hypothalamus tissues were detected by

[收稿日期] 20161210(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460696)

[第一作者] 李婷,从事中医治则治法及其临床应用研究, Tel:0931-8765337, E-mail:gszytl@126.com

[通讯作者] *朱向东,博士,教授,从事中医治则治法及其临床应用研究, Tel:0931-8765337, E-mail:zhuxiangdong33@163.com

immunohistochemistry, and their gene expressions were measured by Real-time PCR method. **Result:** ELISA test results show that compared with control group, model group showed significant increase in content of IL-6 in serum of rats. After drug treatment, the serum IL-6 in drug group were decreased, with the most obvious effect in high-dose Tongxie Yaofang group ($P < 0.05$). Real-time PCR results showed that model group's hypothalamic IL-6 and IL-6R gene expressions were higher than those of blank group ($P < 0.05$). After treatment with drugs, drug group's IL-6 and IL-6R gene expressions were reduced, and 5-ASA and high-dose Tongxie Yaofang groups were superior to the other groups ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining results showed that compared with control group, IL-6 and IL-6R protein expressions of ulcerative colitis rats increased significantly ($P < 0.05$), drug treatment can reduce their hypothalamic IL-6 and IL-6R protein expressions, and 5-ASA and high-dose Tongxie Yaofang groups were superior to the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tongxie Yaofang can obviously inhibit IL-6 and IL-6R gene and protein expressions in hypothalamic tissues of the rat UC model by TNBS/ethanol method, suggesting Tongxie Yaofang's mechanism in the treatment of ulcerative colitis may be correlated with inhibition of abnormal activation of IL-6/IL-6R signaling pathway in hypothalamus.

[**Key words**] Tongxie Yaofang; ulcerative colitis; interleukin-6 (IL-6); interleukin-6 receptors (IL-6R); gene expression; protein expression

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是发生于结肠和直肠处的一种非特异性炎症。由于目前较公认的致病因素有遗传、环境、免疫紊乱等, 西医多运用激素、磺胺类药、免疫抑制剂类药物进行治疗, 虽可见显著疗效, 但停药后易反复、耐药、甚至出现较大的副作用。为寻求更好的治疗效果, 不少患者选择中医调养。有研究认为肝郁脾虚证是溃疡性结肠炎的主要发病机制之一^[1], 临床多出现肠黏膜水肿、糜烂、溃疡、息肉、肠蠕动异常、颗粒感等症状^[2], 痛泻要方治疗 UC 的机制是恢复机体的免疫功能^[3]。课题组前期研究已证实痛泻要方能够有效治疗实验性 UC, 机制可能通过提高结肠组织抗氧化能力和调节结肠组织紊乱的免疫功能以及调控过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)- γ 表达恢复肠黏膜局部免疫失衡^[4-5]。目前对于 UC 的研究局限于结肠局部, 中医整体观念认为神对人体的一切行为活动都具有调控作用。脑为髓海, 主司精神等活动, 结肠局部的损伤是否与大脑中神经递质的改变有关系, 深入地探讨脑、肠之间的关系进行研究对于阐明肝郁脾虚型 UC 的发病机制, 甚至对指导多种慢性病的治疗都至关重要。本实验通过检测痛泻要方

对肝郁脾虚型 UC 模型大鼠下丘脑中白细胞介素-6 (IL-6), 白细胞介素-6 受体 (IL-6R) 表达的影响, 探讨痛泻要方对 UC 的治疗机制。

1 材料

1.1 动物 采用 SPF 级 Wistar 大鼠, 体重 (200 \pm 20) g, 雌雄各半, 由甘肃中医学院科研实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (甘) 2015-0002, 由甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审核通过, 符合实验动物伦理委员会规定。

1.2 试剂 三硝基苯磺酸 (TNBS, 美国 Sigma 公司, 批号 1001861945); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司, 批号 94206); 反转录试剂盒, PCR 试剂盒 (美国 Pmega Corporation 公司, 批号分别为 000007526, 000007654); DAB 显色试剂盒, SP 检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 K156921A, 15155A06); 大鼠 IL-6 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (深圳市达科为生物技术有限公司, 批号 20160); Anti-IL-6 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 GR237998-8); Anti-IL-6R 抗体 (博奥森生物技术有限公司, 批号 AA020701)。引物的设计和合成均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')	长度/bp
IL-6	AGTTACCTCTCTGGGACTGA	ACTGGTCTGTTGTGGGTGCT	102
IL-6R	TTCCTCCTGGTTCCTCTCCT	TCTGTTGCTGTTGTCATTAGGG	123
β -actin	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	141

1.3 仪器与设备 CT14RD 型台式高速冷冻离心机(中国天美科学仪器有限公司);RM2265 型切片机(德国 Leisa 公司);HL-DTS 型大鼠束缚器(北京合力科创公司);Plus10705 型酶标仪,SI000™ 型 PCR 仪,CFX96™ 型 Real-time 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);P100 + 型微量分光光度计(美国 Plexteoh 公司);BI2000 型免疫组化分析系统(成都太盟公司);XS-212-202 型显微镜(济南博华仪器有限公司)。

1.4 药物 痛泻要方(陈皮、白术、白芍、防风)4 味药物组成按原方 3:2:1:1 比例,药物饮片均购于甘肃中医药大学附属医院中药房,由甘肃中医药大学药学院邓毅教授鉴定符合 2015 版《中国药典》规定。中药饮片首先用自来水浸泡 30 min,加入 10 倍体积水武火煎开,文火煎煮 30 min,将药液过筛网滤过;再加入 5 倍量水,武火煮开后转文火煎煮 20 min,过滤。然后将 2 次的药液混合均匀,放 4 ℃ 备用。美沙拉嗪缓释颗粒剂(艾迪莎,上海爱的发制药公司,批号 15523)。

2 方法

2.1 模型建立 采用 TNBS/乙醇溶液灌肠 + 束缚应激、饮食失节法复制 UC 大鼠模型^[6-7]。正常饲养 1 周后,对 Wistar 大鼠进行不定时束缚 1 周,每日 6 h,隔日给食。禁食(不禁水)48 h 后用 10% 水合氯醛腹腔麻醉(0.3 mL·kg⁻¹)后,一次性将 TNBS-乙醇溶液(TNBS 100 mg + 50% 乙醇溶液 0.25 mL)溶液用橡胶输液管轻缓注入大鼠距肛门约 7~8 cm 肠腔内,再注入空气 0.4 mL,然后捏紧肛门,留置几分钟以防溶液外漏,动物保持平躺状态,自然清醒;空白组大鼠采用同样方法用等量的生理盐水进行灌肠。灌肠后继续束缚和隔日给食 2 周,造模结束,模型评价标准参照文献[8]进行评价。

2.2 分组与给药 将造模成功的动物随机分为 5 组:模型组、痛泻要方低、中、高剂量组和 5-ASA 组,每组 15 只。非造模组 15 只作为空白组。痛泻要方分别按生药 2.75,5.5,11 g·kg⁻¹灌胃(相当于 60 kg 成人每日剂量的 2.5,5,10 倍),5-ASA 组每日按 0.5 g·kg⁻¹灌胃(相当于 60 kg 成人每日剂量 7.5 倍),等效剂量按人与动物体型系数折算,灌胃体积为 10 mL·kg⁻¹。空白组和模型组用等体积生理盐水灌胃。各组于造模后第 1 天开始灌胃,1 次/d,连续 21 d 后取材。

2.3 蔗糖水测试大鼠对奖赏的反应 造模前后分别进行 1% 的蔗糖水测试实验,禁水不禁食 48 h 检

测 1 h 的蔗糖水量。通过饮水量测试大鼠对奖赏的反应。

2.4 取材 大鼠禁食不禁水 24 h 后,水合氯醛麻醉并腹主动脉取血后,脱颈椎法处死大鼠,后从颈部剪一横口,然后垂直剪开头部皮肤,从枕骨大孔用眼科剪轻轻剪开颅骨,再用眼科镊轻轻撬开两侧的顶骨,用镊子将全脑端出,取出下丘脑部分,用预冷生理盐水冲洗血液,用滤纸吸干水分,一部分置于无酶冻存管,-80 ℃ 保存;一部分用 4% 的多聚甲醛进行固定。取出结肠,冲洗内容物后先进行肉眼观察评分,用预冷生理盐水冲洗,滤纸吸干,一部分置于无酶冻存管,-80 ℃ 保存,一部分 4% 多聚甲醛固定。

2.5 结肠黏膜损伤评分检测 结肠组织经预冷生理盐水反复冲洗后,平铺于干净滤纸上,对其大体形态进行观察;大体形态损伤评分参照 Luketal 标准进行,0 分,无损伤;1 分,充血但没有溃疡;2 分,充血而且肠壁变厚但没有溃疡;3 分,有 1 处小溃疡,直径约 0~1 cm;4 分,溃疡较大,直径约 1~2 cm,但肠管与外周脏器无粘连;5 分,溃疡直径 1~2 cm,肠管增厚,与周围脏器粘连严重。

2.6 ELISA 法检测 IL-6 水平 将大鼠麻醉腹主动脉取血后,45 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取血清,采用 ELISA 检测 IL-6 水平,操作过程均严格按照试剂盒说明进行,使用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔吸光度 A,并制作标准曲线,计算各组 IL-6 水平。

2.7 免疫组织化学检测相关蛋白表达 制作石蜡切片,进行常规的脱蜡处理,每张切片滴加适量 H₂O₂,室温放置 10 min 后将其浸入 0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸盐缓冲液内进行抗原热修复,待自然冷却至室温后,滴加 5% BSA 封闭液,室温停留 20 min,分别滴加 IL-6,IL-6R 一抗(1:200),4 ℃ 过夜。滴加生物素化山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,37 ℃ 培养箱中孵育 20 min,滴加 SABC,37 ℃ 孵育 20 min,滴加 DAB 显色剂,苏木素轻度复染 3 min,梯度乙醇进行脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,在显微镜下观察。IL-6R 在下丘脑的表达主要在视前区、腹内侧核、室旁核和弓状核,以细胞浆为主,阳性表达为细胞质呈棕黄颗粒染色,颜色越深,表达越强,未出现棕黄颗粒为阴性。采用 BI-2000 免疫组化分析系统,随机选取 6 个视野,测量阳性细胞积分吸光度 IA,IA 越大,蛋白表达强,反之则表达弱。

2.8 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测相关 mRNA 表达 取下丘脑组织 50~100 mg 于无酶管中,加入 Trizol 200 μL,剪碎后再加入 Trizol 800 μL,

匀浆器充分研磨,静置 5 min,4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清,加入三氯甲烷 200 μL,混匀,静置 5 min,4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清,加入等量的异丙醇,轻轻震荡 15 s,静置 10 min,4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 15 min,弃上清,取底部白色沉淀物,加入 75% 乙醇 1 mL 清洗,4 ℃,7 500 r·min⁻¹离心 5 min。弃上清,风干。加入无酶水 30 μL。应用核酸定量分析仪测定 mRNA 的浓度与纯度。按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录,合成 cDNA。用 cDNA 为模板对大鼠 β-肌动蛋白(β-actin)及 IL-6 和 IL-6R 进行 PCR 扩增,扩增反应体系总体积为 20 μL;其中 cDNA 2 μL,MgCl₂ 3 μL;上下游引物各 1 μL;GoTAP PCR Mix 10 μL;Tap DNA 聚合酶 0.2 μL;无酶水 5.8 μL。扩增条件:95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。各样品的荧光信号值由荧光定量仪的支持软件 ABI Prism7000SDS software 实时产生并自动计算定量数值,以 2^{-ΔΔC_t} 作为目的基因的相对表达量。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料服从正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,并进一步用 LSD 做两两比较。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 痛泻要方对各组大鼠一般情况的影响 与空白组比较,造模组大鼠在灌肠当天开始出现稀便,甚至肉眼可见血便。与模型组比较,各痛泻要方中、高剂量组及 5-ASA 组症状较模型组明显好转,大便成形,呈灰褐色,稀便症状基本消失,毛色逐渐光亮润泽,表现活跃,其中以痛泻要方高剂量组疗效最为理想;痛泻要方低剂量组症状缓解不明显。结肠黏膜损伤情况,与空白组比较,模型组大鼠可见结肠黏膜充血、水肿、易脆,伴有不同程度地糜烂及溃疡,肠壁缩短、增厚或扩张,各治疗组大鼠结肠黏膜损伤均有不同程度改善,其中痛泻要方高剂量组及 5-ASA 组各大鼠黏膜恢复情况最为理想。与模型组比较,痛泻要方高剂量组及 5-ASA 组评分明显降低($P < 0.05$),痛泻要方各治疗组间随着给药剂量的增加,评分逐渐降低,痛泻要方高剂量组与 5-ASA 组比较差异无统计学意义。见表 2。

3.2 痛泻要方对各组大鼠蔗糖水奖赏的影响 造模后每只大鼠平均的蔗糖水饮用量减少,造模前平均 19.56 mL·h⁻¹,造模后平均 15.59 mL·h⁻¹。说明模型的复制影响了大鼠对奖赏的反应,印证了肝郁

脾虚模型建立成功。

3.3 痛泻要方对各组大鼠血清中 IL-6 含量的影响 与空白组比较,模型组血清中 IL-6 含量明显升高($P < 0.05$)。经过药物处理后,与模型组比较,各给药组 IL-6 含量均有所下降,其中 5-ASA 组下降明显($P < 0.05$),痛泻要方组高剂量组降低 IL-6 表达效果最为明显($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 痛泻要方对各组大鼠结肠黏膜损伤和血清 IL-6 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effect of Tongxie Yaofang on colonic mucosa damage and IL-6 levels in serum($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	结肠损伤评分/分	IL-6/ng·L ⁻¹
空白	-	0.13 ± 0.35	69.74 ± 5.75
模型	-	4.67 ± 1.23 ¹⁾	91.62 ± 7.25 ¹⁾
5-ASA	0.5	3.33 ± 1.11 ²⁾	77.01 ± 13.60 ²⁾
痛泻要方	11	3.27 ± 1.22 ²⁾	72.76 ± 13.20 ²⁾
	5.5	3.53 ± 0.92 ²⁾	78.11 ± 12.35 ²⁾
	2.72	3.60 ± 1.12 ²⁾	79.92 ± 7.64 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

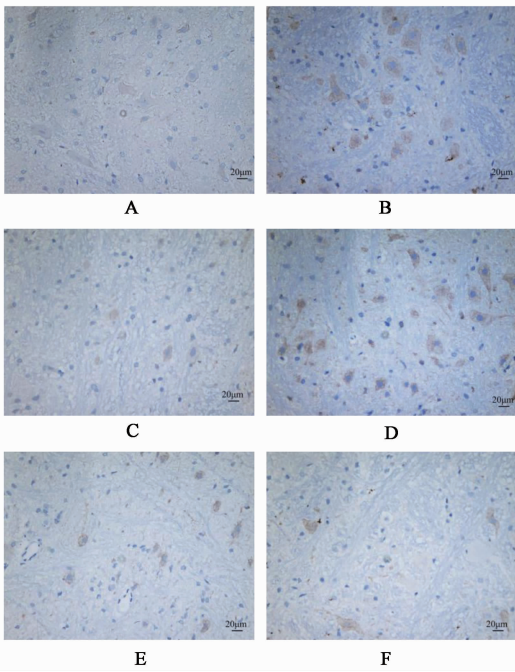
3.4 痛泻要方对各组大鼠下丘脑组织中 IL-6, IL-6R 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠下丘脑组织 IL-6, IL-6R 蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。经过药物处理后,与模型组比较,各药物组 IL-6, IL-6R 蛋白表达均有所下降,其中以 5-ASA 组下降明显($P < 0.05$);痛泻要方高剂量组降低效果最为明显($P < 0.05$)。见图 1, 2, 表 3。

表 3 痛泻要方对各组大鼠下丘脑中 IL-6, IL-6R 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Tongxie Yaofang on protein expression levels of IL-6, IL-6R in rat hypothalamus($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	IL-6R
空白	-	0.402 ± 0.008	0.448 ± 0.014
模型	-	0.455 ± 0.008 ¹⁾	0.493 ± 0.012 ¹⁾
5-ASA	0.5	0.420 ± 0.067 ²⁾	0.477 ± 0.010 ²⁾
痛泻要方	2.72	0.409 ± 0.059 ²⁾	0.453 ± 0.075 ²⁾
	5.5	0.449 ± 0.010 ²⁾	0.483 ± 0.012
	11	0.454 ± 0.012 ²⁾	0.489 ± 0.011

3.5 痛泻要方对各组大鼠下丘脑结肠中 IL-6, IL-6R mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组下丘脑中 IL-6, IL-6R 含量明显上升($P < 0.05$)。经过药物处理后,与模型组比较,各药物组 IL-6, IL-6R 含量均有所下降,其中以 5-ASA 组和痛泻要方高剂量



A. 空白组; B. 模型组; C. 美沙拉嗪组; D ~ F. 痛泻要方 (2.75, 5.5, 11 g·kg⁻¹) 组 (图 2 同)

图 1 痛泻要方对各组大鼠下丘脑组织中 IL-6 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig.1 Effect of Tongxie Yaofang on protein expression of IL-6 in rat hypothalamus (IHC, ×400)

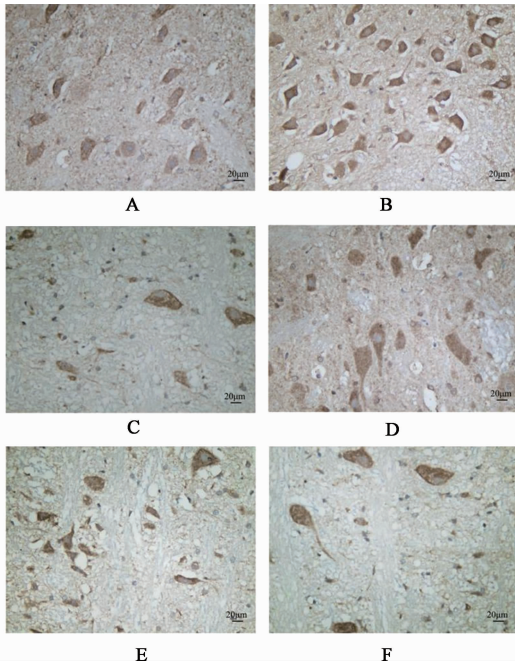


图 2 痛泻要方对各组大鼠下丘脑组织中 IL-6R 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig.2 Effect of Tongxie Yaofang on protein expression of IL-6R in rat hypothalamus (IHC, ×400)

组下降最为明显 ($P < 0.05$)。结肠 IL-6, IL-6R mRNA 表达与下丘脑中表达基本一致。见表 4, 5。

表 4 痛泻要方对各组大鼠下丘脑中 IL-6, IL-6R mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 4 Effect of Tongxie Yaofang on mRNA expression of IL-6, IL-6R in rat hypothalamus ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	IL-6R
空白	-	1.01 ± 0.03	1.01 ± 0.03
模型	-	1.57 ± 0.92 ¹⁾	1.80 ± 1.16 ¹⁾
5-ASA	0.5	1.12 ± 0.36 ²⁾	1.20 ± 0.38 ²⁾
痛泻要方	11	1.21 ± 0.42	1.30 ± 0.25
	5.5	1.16 ± 0.34 ²⁾	1.25 ± 0.60 ²⁾
	2.72	1.13 ± 0.20 ²⁾	1.17 ± 0.34 ²⁾

表 5 痛泻要方对各组大鼠结肠中 IL-6, IL-6R mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 5 Effect of Tongxie Yaofang on mRNA expression of IL-6, IL-6R in rat colon ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	IL-6R
空白	-	1.06 ± 0.43	1.04 ± 0.61
模型	-	4.36 ± 3.89 ¹⁾	4.35 ± 0.38 ¹⁾
5-ASA	0.5	2.21 ± 1.10 ²⁾	1.41 ± 1.06 ²⁾
痛泻要方	11	1.13 ± 0.62 ²⁾	1.13 ± 0.62 ²⁾
	5.5	2.54 ± 1.53 ²⁾	2.77 ± 1.02 ²⁾
	2.72	2.88 ± 2.10 ²⁾	2.21 ± 1.10 ²⁾

4 讨论

溃疡性结肠炎作为一种慢性且易复发的疾病,在生活、工作压力逐渐增大的当今社会中发病率逐年增高,但其病因至今仍然未被明确揭示。为寻求更好的治疗效果,本研究将中医的精髓——整体观念列入假设范畴,通过复制肝郁脾虚的 UC 模型,运用经典方进行干预治疗,痛泻要方作为疏肝健脾法的代表方,首见于《景岳全书》,方中白术健脾燥湿以治脾虚,为君药;芍药养血柔肝,功善酸敛肝阴,为臣药;陈皮理气醒脾和胃,为佐药;配伍少量具升散之性的防风,畅肝郁、舒脾气,又兼有燥湿止泻之功,为脾经引经之药,为佐使之用。全方配伍疏肝理气止痛,补脾胜湿止泻,脾健肝柔,则痛泻自止。近年来,痛泻要方的临床应用研究不断深入,单独或加减化裁后用于治疗慢性溃疡性结肠炎的临床报道非常多。

IL-6 不仅是复杂的机体细胞因子网络中的关键因子,也可调节其他细胞因子的作用,是炎症介质网络的关键成分,可有效管理炎症^[9-11]。有研究表明侧脑室注射 IL-6 有加重应激性溃疡形成的作用^[11],而静脉注射同等剂量的 IL-6 并无此效应,说明 IL-6

的促溃疡机制主要在中枢。Hosur 等^[11]研究表明 IL-6 在下丘脑中参与炎症反应,提示了细胞因子的表达往往为一过性,研究疾病的病程可能需要监测细胞因子的动态变化,同时也揭示了 IL-6 可能在神经系统功能中起重要作用,且一定浓度的 IL-6 能够维持神经细胞的正常生长及其功能。此外,IL-6 对神经系统的发育及神经内分泌系统也具有重要的调节作用,参与机体应激反应^[12-13],促进下丘脑-垂体-肾上腺轴的激活,并与一些神经递质的产生和代谢密不可分,抑制炎症反应。苗平等^[14]研究表明,IL-6 在炎症性疾病中呈高表达趋势。丁永忠等^[15]通过放射免疫法检测发现血清中 IL-6 水平在重型颅脑损伤中明显增高。由此可见近年来 IL-6 常作为一种促炎因子,在 UC 的研究领域多次被提及并用于解释免疫紊乱范畴的炎症性疾病,同时也作为脑-肠轴中的一种重要细胞因子,但在下丘脑中的表达却鲜为报道。

IL-6R 是 IL-6 受体 2 条肽链之一的 α 链,又称特异性结合链,为配基特异性受体,单独 IL-6R 与 IL-6 结合为低亲和力,是最早被发现的造血细胞因子受体超家族成员。IL-6 反式信号转导可能在慢性炎症及某些肿瘤生成中扮演关键性角色^[16]。由于 IL-6 只有与其受体结合才能发挥其生物学活性,通过调节 IL-6R 的水平来调节 IL-6 水平已成为治疗 IL-6 相关疾病的一种可能方式^[17]。

综上所述,IL-6/IL-6R 信号通路在 UC 的发病机制中扮演着重要角色,但过去的研究多集中于炎症局部本身,鲜少从整体的角度去研究。本实验基于中医“整体观念”和“形神合一”的理论,将宏观与微观相结合,通过检测 IL-6, IL-6R 细胞因子在肝郁脾虚型 UC 模型大鼠下丘脑和结肠组织中的表达,发现 IL-6, IL-6R 不仅仅在结肠局部,而且在下丘脑的基因中也有相应的变化,这从分子水平阐明疏肝健脾治疗溃疡性结肠炎的作用机制可能是抑制下丘脑中 IL-6/IL-6R 信号通路的过度活化来治疗溃疡性结肠炎,为痛泻要方防治肝郁脾虚型溃疡性结肠炎提供了一定的实验依据。

[参考文献]

[1] 梁玉杰,张元澧,朱立鸣. 从肝郁脾虚论治溃疡性结肠炎[J]. 时珍国医国药,2012,23(7):1768-1769.
[2] 吴健,王新月,孙慧怡,等. 137 例活动期溃疡性结肠炎患者中医证型与肠黏膜象关系的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(4):445-449.
[3] 刘喜平,贾育新,吴建军. 痛泻要方对溃疡性结肠炎

肝郁脾虚证大鼠模型 CD44、CD54 及 CD62p 的影响[J]. 中药药理与临床,2010,26(6):10-12.
[4] 朱向东,曹燕飞,汪斌,等. 痛泻要方治疗溃疡性结肠炎模型大鼠的药效学机制[J]. 中国老年学杂志,2015,35(3):705-707.
[5] 朱向东,梅晓云,王燕,等. 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.
[6] 李艳彦,谢鸣,陈禹,等. 肝郁脾虚证大鼠模型复制中的免疫系统变化[J]. 中华中医药杂志,2006,21(7):428-429.
[7] 岳嘉,刘建鸿,程晓阳,等. 肝郁脾虚证模型大鼠红细胞和促红细胞生成素变化规律研究[J]. 中国中医药信息杂志,2015,22(3):77-79.
[8] 郭建丽,冯玛莉,宋美卿,等. 情志刺激致大鼠肝郁脾虚证模型的研究[J]. 中华中医药杂志,2012,27(11):2976-2978.
[9] 苏芸,谢泽锋,李康生. 精神应激 Balb/c 小鼠不同部位脑组织中 IL-1 β 及 IL-6 水平的变化[J]. 广东医学,2008,29(9):1446-1448.
[10] 杨舒,钱会南. 扶正益气中药对脾虚大鼠脑内 IL-6RA 水平及其基因表达的影响[J]. 安徽中医学院学报,2010,29(4):49-50.
[11] Hosur V, Loring R H. $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptors partially mediate anti-inflammatory effects through Janus kinase 2-signal transducer and activator of transcription 3 but not calcium or cAMP signaling[J]. Mol Pharmacol,2011,79(9):167-174.
[12] 申延琴,李康生,罗燕玲. 帕金森病 MPTP 处理小鼠下丘脑和海马 IL-1 β 和 IL-6 水平变化[J]. 中国神经科学杂志,2004,20(6):456-459.
[13] 苏芸,谢泽锋,李康生. 精神应激 Balb/c 小鼠不同部位脑组织中 IL-1 β 及 IL-6 水平的变化[J]. 广东医学,2008,29(9):1446-1448.
[14] 苗平,陆梅生,张冬青. IL-6/IL-6 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展[J]. 免疫学杂志,2011,27(4):355-360.
[15] 丁永忠,孙群周,张建生. 急性颅脑损伤后血清 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 含量变化及其临床意义[J]. 中国临床神经外科杂志,2006,11(1):17-19.
[16] Mitsuyama K, Sata M, Rose-John S. Interleukin-6 trans signaling in inflammatory bowel disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2006,17(6):451-461.
[17] 林丽艳,张慧云,何韶衡. IL-6 及其受体与炎症性疾病关系的新进展[J]. 中国热带医学,2008,4(8):680-682.

[责任编辑 张丰丰]