

· 经典名方 ·

3首止泻名方治疗溃疡性结肠炎大鼠的相关机制对比分析

马旭冉¹, 王彦礼¹, 邹迪新¹, 王敦方¹, 宋红新¹, 杨伟鹏^{1*}, 葛永祥^{2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京市中西医结合医院, 北京 100039)

[摘要] 目的:对比研究黄芩汤、四神丸、痛泻要方3首止泻名方对大鼠溃疡性结肠炎(UC)炎症反应、水运调节及脑肠轴的影响。方法:42只SPF级雄性SD大鼠,以2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)复合造模法制备UC大鼠模型,按体质量随机分为正常组、模型组、阳性药柳氮磺胺吡啶组(SASP, 0.5 g·kg⁻¹),黄芩汤组(Huangqintang, HQT, 20 g·kg⁻¹),四神丸组(Sishen Wan, SSW, 26 g·kg⁻¹)和痛泻要方组(Tongxie Yaofang, TXYF, 22 g·kg⁻¹)。连续给药5 d后,大鼠眼眶取血并处死取结肠,苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠结肠组织病变损伤程度,酶联免疫吸附测定(ELISA)结合免疫组化(IHC)测定大鼠血清及结肠组织内血管活性肠肽(VIP),5-羟色胺(5-HT),P物质(SP)分布,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠组织内水通道蛋白3(AQP3),水通道蛋白4(AQP4)蛋白水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠结肠组织内细胞外调节蛋白激酶1(Erk1),p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK) mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组5-HT, VIP含量均显著下降($P<0.01$),SP含量降低,但未见显著性统计学差异;与模型组比较,SASP组和TXYF组5-HT含量明显升高($P<0.05$),SASP组,HQT组,TXYF组VIP,SP含量均明显升高($P<0.05$)。与正常组比较,模型组AQP3含量显著升高($P<0.01$),AQP4含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,HQT组AQP3含量显著降低($P<0.01$),SASP组,HQT组AQP4含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组Erk1,p38 MAPK mRNA表达均显著降低($P<0.01$),HQT组降低趋势最为显著。结论:3首名方对大鼠溃疡性结肠炎均有一定治疗作用,可有效改善UC大鼠的体征及精神状况,但在改善泄泻状态下脑肠轴紊乱方面,TXYF治疗作用优于HQT和SSW,在抑制炎症反应及调节水运平衡方面,HQT治疗作用优于TXYF和SSW。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 脑肠肽; 水通道蛋白; 炎症反应; 作用机制

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202004

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200727.1016.007.html>

[网络出版日期] 2020-7-27 13:30

Comparison of Related Mechanism in Rats with Ulcerative Colitis After Treatment of Three Regiments

MA Xu-ran¹, WANG Yan-li¹, ZOU Di-xin¹, WANG Dun-fang¹, SONG Hong-xin¹, YANG Wei-peng^{1*},
GE Yong-xiang^{2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Beijing Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** This study was designed to compare inflammatory response, water carriage and gut brain axis in rats with ulcerative colitis (UC) after treatment of three regiments, Huangqintang (HQT), Sishenwan (SSW), and Tongxie Yaofang (TXYF). **Method:** After approved by Institute of Chinese Materia Medica Ethics Committees in China Academy of Chinese Medical Sciences, UC in rats was induced by using a compound method (trinitrobenzenesulfonic acid plus ethanol). Rats were randomly divided into control,

[收稿日期] 20200302(024)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473592, 81273662); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT17029, ZXKT18016)

[第一作者] 马旭冉, 博士, 从事中药药理学研究, E-mail: maxuran194@163.com

[通信作者] * 杨伟鹏, 博士, 研究员, 从事中药药理学研究, E-mail: hrbywp@sina.com;

* 葛永祥, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合治疗胃肠道病和肝病研究, E-mail: gyx19722007@163.com

disease, positive control salazosulfapyridine (SASP, $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), HQT ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), SSW ($26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and TXYF group ($22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). After 5 days of treatment, colonic tissues and the blood were taken for various assays. Damage of colonic tissues was detected by hematoxylin-eosin staining (HE). The distribution of Vasoactive intestinal (VIP), 5-hydroxytryptamine (5-HT), P-substance (SP) in the blood and serum were detected by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry (IHC), the levels of aquaporin3 (AQP3) and Aquaporin4 (AQP4) in the serum were detected by Western blot, the mRNA expression of Extracellular regulated protein kinases 1 (Erk1) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in the serum were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR).

Result: The brain-gut peptide results showed that compared with the normal group, the content of 5-HT and VIP in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), the content of SP were decreased, but there was no significant statistical difference, compared with the disease group, the content of 5-HT in SASP and TXYF group were clearly increased ($P < 0.05$), the increment of VIP and SP in SASP, HQT, TXYF group were significant ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the content of AQP3 in model group were significantly increased ($P < 0.01$), the content of AQP4 were clearly decreased ($P < 0.01$), compared with the disease group, the content of AQP4 in SASP and HQT group were clearly increased ($P < 0.05$), whereas the levels of AQP3 in HQT group were most significant reduced ($P < 0.01$). Compared with the disease group, the expression of Erk1 and p38 were clearly reduced ($P < 0.01$), with the most significant reduce being the expression in HQT group.

Conclusion: Three regiments all have therapeutic effects on UC, manifested by improvements of the signs and mental status of UC rats. However, in terms of gut-brain axis disturbance improvement, the therapeutic effect of TXYF was superior than HQT and SSW, whereas in terms of inflammatory response suppression and water carriage accomodation, the therapeutic effect of HQT was superior than SSW and TXYF.

[Key words] ulcerative colitis; brain gut peptide; aquaporin; inflammatory response; function mechanism

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性炎症性结肠疾病,特征表现为结肠黏膜由直肠起始并延续至结肠近段的大面积溃疡,UC的疾病过程包括潜伏期与发作期,临床常见症状有腹痛、腹泻、黏液脓血便、发热、体质量减轻等,病程漫长伴随间歇性发作,严重影响患者的生活质量^[1]。临床常用氨基水杨酸盐如美沙拉嗪等来缓解症状,但因其副作用强烈无法长期维持治疗,亟求新的治疗手段。中医理论认为,同一种疾病常因病情发展阶段、个人体质或所处环境不同而呈现不同的病机与证候,应对其外在表现进行辨证论治后,根据不同的治则治法来对症用药^[2]。UC属中医诊疗理论中的“泄泻”范畴,常在疾病的不同阶段表现出不同的证候,如大肠湿热型、肝郁脾虚型、脾肾阳虚型等,因此多采用不同的方剂进行治疗。黄芩汤源于《伤寒论》,用于治疗大肠湿热型泄泻较为对症;四神丸见于《证治准绳》,用于脾肾阳虚型泄泻尤为适宜;痛泻要方载于《丹溪心法》,针对肝郁脾虚型泄泻疗效显著。课题组前期研究证实黄芩汤可通过介导核转录因子- κB (NF- κB), Toll样受体4/髓样分化因子(TLR4/

MyD88)等信号通路抑制炎症介质的过度生成,对炎症损伤具有确切的治疗作用。还可通过增加肠道内益生菌丰富度、调节肠道微生态平衡来对UC进行治疗。但尚未对四神丸,痛泻要方进行深入研究,且并未将中药复方的药效与中医理论相结合。本实验以中医理论为指导,将黄芩汤、四神丸、痛泻要方3首复方应用于UC动物模型,通过对相关指标的检测来对比研究3首止泻名方在炎症反应、脑肠轴互动、水运调节等方面的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,体质量180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006。饲养于清洁级动物房,温度为(23 ± 1.5) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为(45 \pm 15)%。实验方案经中国中医科学院中药研究所伦理委员会审议同意并批准。

1.2 药品与试剂 黄芩、白芍、炙甘草、大枣、补骨脂、肉豆蔻、五味子、白术、陈皮、防风均购自北京华邈药业有限公司,吴茱萸购自北京仟草中药饮片有限公司,经中国中医科学院中药研究所李先端研究

员鉴定为合格药材。将黄芩汤、四神丸、痛泻要方饮片分别按3:2:2:2,4:2:1:2,6:4:3:2的比例配伍后,称取药材见表1,将药材分别加10倍水浸泡1 h后,开火煎煮,大火煮至沸腾后转为小火,小火煎煮1 h后,过滤得初滤液,再加入8倍水后开火煎煮,沸后转小火,煎煮1 h后关火,过滤得续滤液,混合初滤液与续滤液,将混合后的药液浓缩至质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。最终得到黄芩汤216 mL,四神丸216 mL,痛泻要方216 mL。将药液储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用,用时解冻。取40片柳氮磺胺吡啶溶于200 mL水中,现用现配。2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma公司,批号P2297);柳氮磺胺吡啶肠溶片(SASP,上海信谊天平药业有限公司,批号09170726);5-羟色胺(5-HT)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号JL13043-96T);兔抗鼠血管活性肠肽(VIP),P物质(SP)多克隆抗体(美国CST公司,批号分别为37973,9389);兔抗鼠水通道蛋白3(AQP3),AQP4多克隆抗体(美国Abcam公司,批号分别为AB5200111,HPA014784);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为ZB-5301,ZB-5305);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G1120);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P0010);DAB显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号AR1022)。

表1 3首复方组方配伍

Table 1 Quantity of medicinal materials

黄芩汤	四神丸	痛泻要方
炒白芍 60.2 g	煨肉豆蔻 59.7 g	防风 36.1 g
大枣 60.2 g	制吴茱萸 30.4 g	麸炒白术 108.2 g
黄芩片 90.1 g	盐补骨脂 120 g	陈皮 54.1 g
炙甘草 59.9 g	醋五味子 60.1 g	炒白芍 72 g

1.3 仪器 HH系列数显恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司);GL-88B型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);DM 2500 LED型生物显微镜,Leica Microsystems型超高分辨显微镜(德国Leica公司);Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo公司);Gene Amp PCR System 9700型基因扩增仪,ViiA 7型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪,Agilent 2100型生物分析仪(美国Agilent公司)。

2 方法

2.1 造模与取样 将大鼠适应性饲养后禁食不禁水24 h后制备UC模型,大鼠腹腔注射20%乌拉坦($800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉后一次性将TNBS混合溶剂($\text{TNBS } 100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}+50\% \text{乙醇 } 0.25\text{ mL}$)注入大鼠肛门上方约8 cm处,捏紧肛门,倒置5 min。正常组给予相等体积的生理盐水,造模后2 h左右大鼠恢复意识,开始自由活动,术后常规饲养。大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、阳性药SASP组、黄芩汤组、四神丸组、痛泻要方组,每组7只。造模3 d后开始灌胃给药,按临床成人用量10倍折算后给予 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的阳性药SASP($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$);黄芩汤、四神丸、痛泻要方的剂量分别为20,26,22 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$);正常组和模型组灌胃以同等体积的生理盐水,每日1次,连续5 d。末次给药后大鼠禁食不禁水24 h,对各组大鼠进行眼眶取血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,分离上层血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取血后处死大鼠,取距肛门8 cm处结肠组织4~5 cm,沿肠系膜边缘仔细剪开肠腔,用预冷的生理盐水冲洗肠道内容物,洗涤完毕后剪为2段,一段冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,另一段置于10%多聚甲醛中固定,进行常规病理切片及染色^[6]。

2.2 行为学检测 观察大鼠造模前后及给药期间的精神状态并记录体质量。

2.3 HE染色检测结肠组织病理学变化 镜下观察结肠组织形态,按常规步骤进行包埋、切片,切片厚度为 $4\text{ }\mu\text{m}$,随即进行HE染色,高倍镜下选取视野,根据溃疡大小、炎症浸润情况及内部结构损伤程度等进行结肠组织病变损伤程度统计和比较。

2.4 ELISA检测大鼠血清中5-HT含量 严格按照试剂盒说明书规范操作。

2.5 免疫组化检测大鼠结肠组织中VIP,SP蛋白表达 将结肠组织用多聚甲醛充分固定后,进行常规脱水、浸蜡、包埋、切片,然后二甲苯脱蜡、梯度浓度乙醇水化。用配制好的复合液与修复液进行抗原修复,磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后用 $3\%\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液孵育15 min。滴加稀释后的VIP单克隆抗体(1:200),SP单克隆抗体(1:2 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS清洗3次后滴加HRP标记抗兔IgG, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,然后PBS反复冲洗,DAB染色、常规脱水后用中性树脂封片,晾干后镜下观察。400倍镜下单张切片随机选取3个视野,以出现棕黄色颗粒为阳性指标,拍摄后用Image J软件检测VIP及SP积分光密度,具体数值以均值来表示。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 AQP3, AQP4 蛋白的表达 提取大鼠结肠组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 将蛋白样品 SDS-PAGE 电泳转膜后, 封闭 1.5 h, 以单克隆抗体 AQP3 (1:3 000), AQP4 (1:2 000), β -actin (1:1 000) 浓度进行一抗孵育, 4 °C 过夜后用 TBST 洗膜, 再以二抗 (1:5 000) 浓度室温下孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次后向膜表面滴加发光液, 室温下复温 2 min 后用凝胶成像仪进行显影病分析蛋白条带灰度值, 分别计算 AQP3, AQP4 与 β -actin 的比值来评价蛋白表达情况。

2.7 Real-time PCR 检测 Erk1, p38 mRNA 的表达 将样品组织匀浆后进行两相分离, 沉降 RNA 并清洗后再次溶解 RNA 沉淀, 紫外吸收法检测 RNA 质量合格后配制退火复合物与 Real-time PCR 反应液, 设计引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 2, 配置 PCR 反应体系, 加样后将 384-PCR 板置于 Real-time PCR 仪上进行反应, 首先在 95 °C 条件下反应 10 min 后, 进行 40 个收集荧光的 PCR 循环 (95 °C 10 s, 60 °C 60 s)。为了构建 PCR 产物的熔解曲线, 等 PCR 扩增反应完成后, 再按 95 °C 10 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s 程序进行反应, 并从 60 °C 缓慢加热到 99 °C。

表 2 PCR 引物序列

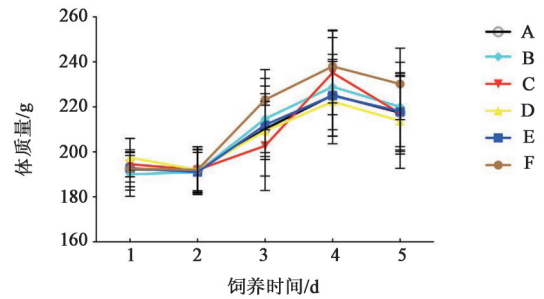
Table 2 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
β -actin	上游 5'-CGAGTACAACCTTCTTGCAGC-3'	202
	下游 5'-ACCCATACCCACCATCACAC-3'	
Erk1	上游 5'-GGACCGGATGTTAACCTTTA-3'	100
	下游 5'-TGGTTCATCTGTCGGATCAT-3'	
p38	上游 5'-ATGACGAAATGACCGGCTAC-3'	141
	下游 5'-ACAACGTTCTCCGGTCAAC-3'	

2.8 统计学方法 实验数据用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 3 首复方对 UC 大鼠行为学表现的影响 TNBS 复合造模后的大鼠行为学表现有喜扎堆、精神不振、双目无光、毛发晦暗、进食量减少、体质量降低, 大鼠在 3 d 内出现恶臭黏液便, 部分大鼠有脓血便排出。给药治疗 5 d 后, 阳性药 SASP 组、黄芩汤组、四神丸组大鼠精神恢复、进食量增加、腹泻症状有明显改善; 痛泻要方组大鼠仍无成形便; 模型组大鼠精神状况与腹泻症状均未有明显改善, 大鼠体质量变化见图 1。



A. 痛泻要方组; B. 四神丸组; C. 黄芩汤组; D. 柳氮磺胺吡啶组; E. 模型组; F. 正常组

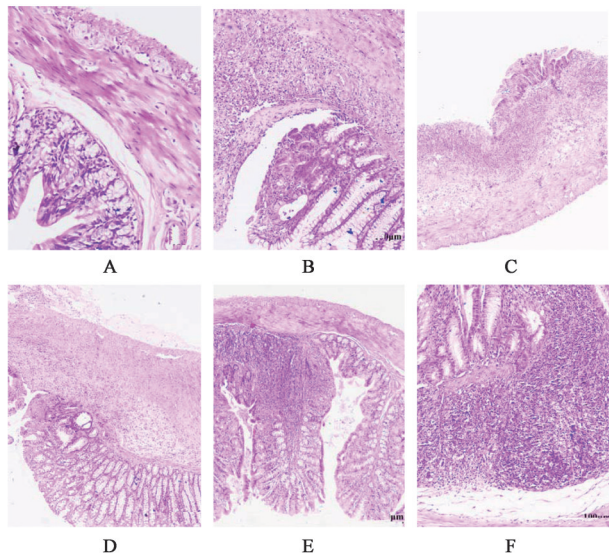
图 1 3 首复方对大鼠体质量影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig. 1 Body weight change after TNBS induction of colitis ($\bar{x} \pm s, n=7$)

3.2 3 首复方对大鼠结肠组织病理学的影响 正常组结肠组织黏膜结构完整清晰, 腺体排列有序, 未见明显炎性细胞浸润; 模型组结肠可见多处深达肌层组织的溃疡, 腺体损伤严重, 表现为坏死、萎缩, 有大量炎性细胞如中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等在黏膜层、黏膜下层、肌层等部位浸润; 阳性药 SASP 组结肠组织偶见溃疡, 部分区域有黏膜腺体结构破坏与少量炎性细胞浸润; 黄芩汤组结肠组织见多处表浅溃疡形成, 损伤处可见黏膜下层组织破坏; 四神丸组结肠组织见多处溃疡形成, 部分黏膜腺体脱落、黏膜下层坏死伴大量炎性细胞浸润; 痛泻要方组见多处溃疡形成, 表浅处有黏膜腺体损伤, 深在部位可见黏膜下层组织破坏, 有炎性细胞浸润。与模型组比较, SASP 组大鼠结肠黏膜炎性浸润、腺体溃疡等病变情况明显减轻, 黄芩汤组、四神丸组和痛泻要方组的病变程度均有不同程度减轻, 黄芩汤改善程度最为显著, 痛泻要方组改善程度不明显。见图 2。

3.3 3 首复方对 UC 大鼠脑肠轴 5-HT 含量的影响 与正常组比较, 模型组 5-HT 含量显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, SASP 组、痛泻要方组 5-HT 含量明显升高 ($P < 0.05$), 黄芩汤组、四神丸组含量升高但无显著性差异。见表 3。

3.4 3 首复方对 UC 大鼠结肠组织 VIP, SP 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠结肠组织 VIP 水平显著降低 ($P < 0.01$), 模型组 SP 含量均明显降低, 但差异无统计学意义; 与模型组比较, SASP 组、黄芩汤组、痛泻要方组大鼠结肠组织 VIP, SP 水平明显升高 ($P < 0.05$), 四神丸组结肠组织 VIP, SP 水平升高, 但差异无统计学意义。见图 3, 4, 表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 柳氮磺胺吡啶组; D. 黄芩汤组; E. 四神丸组; F. 痛泻要方组(图3~5同)

图2 3首复方对大鼠结肠组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of three compound on colon tissue damage of rats (HE, ×400)

表3 3首复方对TNBS大鼠结肠5-HT含量的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 3 Effect of three different compounds on concentration of 5-HT in serums of TNBS rats($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5-HT/ng·L ⁻¹
正常	-	2.04±0.58
模型	-	1.64±0.16 ²⁾
SASP	0.5	1.96±0.27 ³⁾
黄芩汤	20	1.81±0.19 ²⁾
四神丸	26	1.77±0.28
痛泻要方	22	1.88±0.32 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01(表4~6同)。

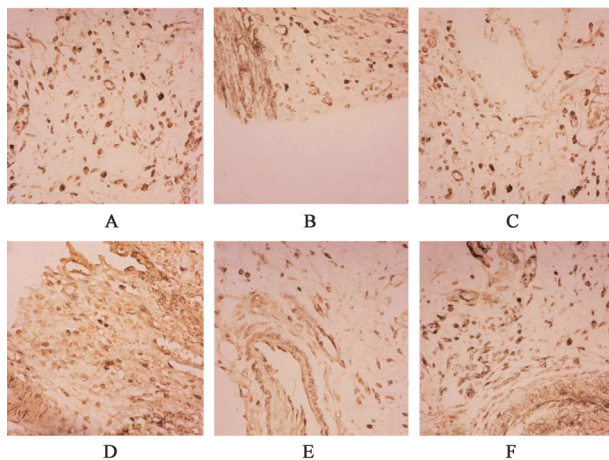


图3 3首复方对TNBS大鼠结肠内VIP表达影响(IHC, ×400)

Fig. 3 Effect of three different compounds on expression and concentration of VIP in colon tissues of TNBS rats(IHC, ×400)

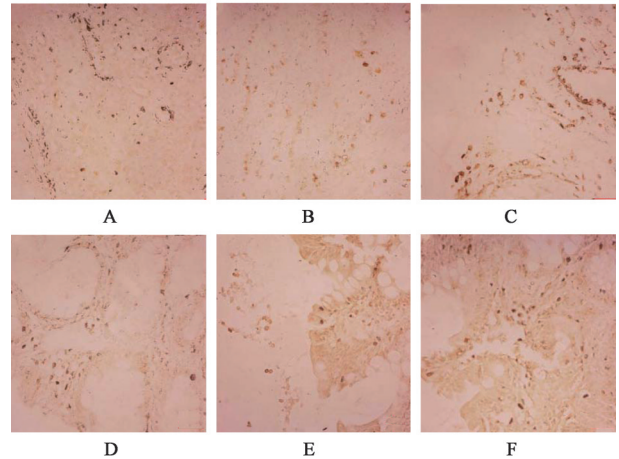


图4 3首复方对TNBS大鼠结肠内SP表达影响(IHC, ×400)

Fig. 4 Effect of three different compounds on expression and concentration of P-substance (SP) in colon tissues of TNBS rats (IHC, ×400)

3.5 3首复方对UC大鼠AQP3, AQP4蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织AQP3水平显著升高, AQP4含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄芩汤组大鼠结肠组织AQP3水平显著降低($P<0.01$), SASP组、痛泻要方组、四神丸组大鼠结肠组织AQP3含量明显降低($P<0.05$), SASP组、黄芩汤组大鼠结肠组织含量明显升高($P<0.05$);四神丸组、痛泻要方组AQP4含量未见升高且差异无统计学意义。见图5,表5。

3.6 3首复方对UC大鼠Erk1, p38 mRNA表达的影响 与模型组比较, SASP组、黄芩汤组、四神丸组、痛泻要方组结肠内Erk1, p38 mRNA表达均显著降低($P<0.01$)。见表6。

4 讨论

UC的发病机制至今尚未明确,近年来许多研究表明,可能与心因性因素有关,如抑郁、焦虑等。脑肠轴异常可能是诱发UC患者对各种心因性刺激的运动反应增强及内脏高敏感的主要因素,同时UC发病导致的慢性心理应激也会反向作用引起脑肠轴功能紊乱^[7]。作为小肠中已知的起源因子, VIP是一种内源性神经肽,是重要的神经递质与器官组织调节剂, DELGADO等^[8]对VIP的机制研究表明,在远端结肠的炎症状态下, VIP有助于逆转分泌效应并改变腹泻表型,改善UC发病的严重程度。5-HT的信号异常与慢性腹痛密切相关,在肠动力紊乱、内脏感觉信号传导等方面扮演着重要角色^[9]。FANG等^[10]认为, SP在UC的发病机制中起重要作用,可改善肠道血管分布、增强免疫并调节肠道运动, SP既可通过抑制激活NF- κ B信号通路来改善肠

表4 3首复方对TNBS大鼠结肠内VIP,SP表达影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 4 Effect of three different compounds on concentration of VIP, SP in colon tissues of TNBS rats($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VIP	SP
正常	-	0.414±0.020	0.314±0.042
模型	-	0.237±0.028 ²⁾	0.260±0.040
SASP	0.5	0.312±0.040 ³⁾	0.302±0.038 ³⁾
黄芩汤	20	0.367±0.041 ³⁾	0.304±0.016 ³⁾
四神丸	26	0.306±0.064	0.283±0.064
痛泻要方	22	0.388±0.039 ³⁾	0.308±0.028 ³⁾

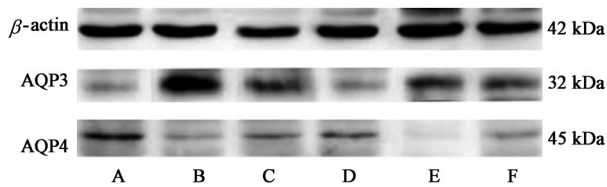


图5 TNBS大鼠结肠内AQP3,AQP4蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of AQP3 and AQP4 protein expression on colon tissues of TNBS rats infected

道损伤,还可促进干细胞增殖来促进结肠黏膜愈合。对比3首复方干预治疗前后的实验结果发现,黄芩汤与痛泻要方均能促进结肠内VIP,SP含量显著升高,且痛泻要方治疗后的大鼠体内VIP,SP含量高于黄芩汤,痛泻要方还可显著提高结肠内5-HT含量。推测痛泻要方调控脑肠轴互作的效果优于黄芩汤与四神丸可能与其调节5-HT信号异常,从而改善UC病理状态下的胃肠运动紊乱、松弛内脏高

敏感、抑制腹痛与腹泻;并促进VIP,SP分泌增加、抑制炎症因子生成、加快结肠黏膜损伤修复、增强肠道免疫功能有关。

UC病理状态下的慢性腹泻症状可能是离子转运通道受损与功能失调的双重诱发,导致肠道上皮发生“渗漏”,这种“渗漏”可能是UC发病的主要或次要机制^[11]。水通道蛋白参与机体内皮细胞和上皮细胞的流体运输,对于跨细胞水运动、细胞稳态维持和增殖有重要意义,LAFORENZA等^[12]发现通过抑制结肠组织MAPK信号通路激活可调控AQP的表达水平,UC特征性的免疫系统慢性激活可能与水运调节紊乱诱发的肠黏膜通透性改变进而导致溶质与脂质泄露、肠道炎症反应、肠细胞对细菌摄取增多有关。AQP3参与肠细胞增殖,在机体水液运化中与维持肠腔表面湿润及肠上皮结肠功能完整密切相关^[13],机体内AQP3的高表达有助于结

表5 3首复方对TNBS大鼠结肠内AQP3,AQP4蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 5 Effect of three different compounds on expression and concentration of AQP3, AQP4 protein in colon tissues of TNBS rats($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP3/ β -actin	AQP4/ β -actin
正常	-	0.169±0.102	0.277±0.013
模型	-	0.761±0.120 ²⁾	0.163±0.049 ²⁾
SASP	0.5	0.522±0.075 ³⁾	0.237±0.033 ³⁾
黄芩汤	20	0.453±0.088 ⁴⁾	0.238±0.035 ³⁾
四神丸	26	0.537±0.062 ³⁾	0.004±0.002
痛泻要方	22	0.522±0.087 ³⁾	0.153±0.037

表6 3首复方对TNBS大鼠结肠组织Erk1,p38 mRNA表达影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 6 Effect of three different compounds on concentration of Erk1 and p38 in serums of rats ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Erk1	p38
模型	-	2.258±0.326	1.386±0.077
SASP	-	0.837±0.092 ⁴⁾	0.577±0.051 ⁴⁾
黄芩汤	0.5	0.703±0.083 ⁴⁾	0.642±0.043 ⁴⁾
四神丸	20	0.795±0.111 ⁴⁾	0.784±0.062 ⁴⁾
痛泻要方	26	0.809±0.070 ⁴⁾	0.852±0.057 ⁴⁾

肠上皮细胞吸收水分,促进肠细胞增殖,提高水液运输效率^[14-15]。AQP4可通过调节上皮细胞的胞内特性来参与结肠炎症反应,与炎症反应过程中上皮细胞损伤后修复密切相关^[16],AQP4还可直接影响肠道肌群活动,作用机制可能与其参与控制水液跨黏膜运动反射有关^[17]。实验结果显示,黄芩汤、四神丸、痛泻要方均有降低大鼠结肠组织内AQP3含量的作用,黄芩汤干预后的大鼠组织内AQP3含量最低,黄芩汤还可促进大鼠结肠组织内AQP4高表达。黄芩汤能够显著减少粪便含水量、脓血便、黏液便等临床表现可能与其降低机体内AQP3表达来减缓肠道内外水液转运效率,使肠黏膜通透性降低,同时促进AQP4高表达从而提高肠腔免疫防御功能有关。

肠上皮细胞(IECs)暴露于大量有细胞毒性的化合物中,包括活性氧、炎性因子、管腔抗原和炎症状态下黏膜中的诱导凋亡配体,MAPK通路调控IECs内白细胞介素-4(IL-4),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),一氧化氮(NO),前列腺素E₂(PGE₂)等炎性因子的生成和释放。Erk1信号是细胞增殖与保护的开关,负责调节疼痛与炎症反应,对抑制UC上皮细胞凋亡和调节细胞保护作用有重要意义^[18];p38广泛分布于各种组织中,可被多种细胞因子(TNF- α ,IL-1等)、脂多糖、应急刺激(热休克、高渗损伤、缺血再灌注)等激活^[19-20],p38还可影响磷酸化组蛋白H3上游的NF- κ B,NF- κ B抑制蛋白激酶(I κ K),NF- κ B p65活性^[21]。实验结果显示,3首复方均能显著抑制结肠内Erk1,p38 mRNA表达,黄芩汤治疗后的大鼠结肠内Erk1,p38 mRNA表达最低。这与课题组前期研究发现黄芩汤可减少IL-4,TNF- α ,NO,PGE₂等炎症介质的释放、下调Erk1,p38基因表达从而通过抑制MAPK信号通路活化来发挥抗炎作用相一致,黄芩汤更适用于作为UC的抗炎靶点治疗药物^[22-23]。

中医临床治疗泄泻多以虚实轻重、泻下物、腹痛、久泻等为辨证要点,治疗原则以健脾化湿止泻为主,常将四神丸用于脾肾阳虚之久泻不愈,黄芩汤多针对大肠湿热型泄泻,痛泻要方用于表证为肠鸣腹痛、泻伴腹痛、泻后痛减的肝郁脾虚型泄泻。“方证对应”是指在对疾病进行治疗时所用的方剂必须与证候相对应,方随证立。方证对应是用来描述方剂和证候二者之间关系的概念,是指方剂的诊疗范围和组方思维与临床上患者表现出的主要症状和病机相一致,重视方与证的对应。无论是辨证

论治抑或是方剂辨证,都应以方证对应作为原则和治疗目的。方证对应思想的科学内涵是通过方与证之间存在的复杂联系,筛选方剂的最适人群,实现个体化治疗方案。本实验采用的是TNBS模型,更接近于中医证候里的大肠湿热型泄泻,因此综合实验结果及中医理论思想来看,黄芩汤对于UC的治疗作用最为对证,其余两方也有一定的治疗作用。后续将建立肝郁脾虚型泄泻、脾肾阳虚型泄泻的模型,进一步对比3首复方用于不同证候泄泻的作用机制,对中医方证对应等辨证论治的理论思想进行阐释与证明。

[参考文献]

- [1] SHAPIRO J M, ZOEGA H, SHAH S A, et al. Incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Rhode Island: report from the Ocean State Crohn's and Colitis Area Registry[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(6):1456-1461.
- [2] LI X Y, DAI M T, CHAI K F. Analysis on the application of treating the same disease with different therapies and treating different disease with the same therapy in Jingui Yaolue[J]. *Chin J Traditi Chin Med Pharm*, 2017, 32(10):4351-4354.
- [3] LI T, ZHUANG S X, WANG Y W, et al. Flavonoid profiling of a traditional Chinese medicine formula of Huangqin Tang using high performance liquid chromatography[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(2):148-157.
- [4] SU J, LIU Y L, GUO Y, et al. Simultaneous determination of 7 active constituents in Si-Shen-Wan by multi-wavelength HPLC[J]. *J of Drug Anal*, 2013, 33(9):1531-1537.
- [5] HU Y, ZHENG Y L, MEI Q X, et al. Simultaneous determination of seven active ingredients in Tong-Xie-Yao-Fang and pieces by UPLC [J]. *Traditi Chin Med And Clin Pharmacol*, 2017, 28(6):786-791.
- [6] MA X R, WANG Y L, ZOU D X, et al. Comparison of intestinal bacteria and inflammatory cytokine expression in rats with ulcerative colitis after treatment of three regimens[J]. *Acta Pharm Sin*, 2019, 54(7):1241-1250.
- [7] LI X L, ZHANG Y J, LAI B Y, et al. Kangfuxin (*Periplaneta americana*) lotion for adjunctive treatment of ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *World J Traditi Chin Med*, 2018, 4(3):77-84.
- [8] DELGADO M, GANEA D. Vasoactive intestinal

- peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(1):25-39.
- [9] YU F Y, HUANG S G, ZHANG H Y, et al. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(12):3451-3459.
- [10] FANG K, LAW I K, PADUA D, et al. MicroR%NA-31-3P is involved in substance P (SP) associated inflammation in human colonic epithelial cells and experimental colitis [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(3):586-599.
- [11] KREIDA S, TORNROTH-HORSEFIELD S. Structural insights into aquaporin selectivity and regulation [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2015, 33:126-134.
- [12] LAFORENZA U. Water channel proteins in the gastrointestinal tract [J]. *Mol Asp Med*, 2012, 33(5/6):642-650.
- [13] ZHAO G, LI J, WANG J, et al. Aquaporin 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(1):161-166.
- [14] JONATHAN J, HANSEN M D, LISA H, et al. Gene expression patterns in experimental colitis in IL-10 deficient mice [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15(6):890-899.
- [15] 甘江华, 黄琦璠, 彭代银, 等. 3种石斛对脾阴虚型大鼠便秘的治疗作用及其机制初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(12):2600-2606.
- [16] NAKAYAMA S, MIGLIATI E, AMIRY-MOGHADDAM M, et al. Osmotherapy with hypertonic saline attenuates global cerebral edema following experimental cardiac arrest via perivascular pool of aquaporin-4 [J]. *Crit Care Med*, 2016, 44(8):e702-e710.
- [17] KUNZELMANN K, MALL M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(1):245-289.
- [18] BALIGA M S, JOSEPH N, VENKATARANGANNA M V, et al. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations [J]. *Food Funct*, 2012, 3(11):1109-1117.
- [19] SETIA S, NEHRU B, SANYAL S N. Upregulation of MAPK/Erk and PI3K/Akt pathways in ulcerative colitis associated colon cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(8):1023-1029.
- [20] 徐冬梅, 陈勇, 方朝晖, 等. 基于MAPK途径探讨丹蛭降糖胶囊改善高脂血症大鼠肝损伤的机制 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(14):2953-2959.
- [21] YU L, YAN J, SUN Z. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4):2239-2346.
- [22] 张会会. 黄芩汤抗炎药效及其作用机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [23] WANG D F, WANG Y L, WANG Y W, et al. Effect of Huangqin Tang the function of regulatory TLR4/MyD88 signal pathway in rats with ulcerative colitis [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2016, 51(10):1558-1563.

[责任编辑 周冰冰]