

· 配伍 ·

黄连-厚朴配伍对溃疡性结肠炎模型大鼠的保护作用及对凋亡因子的影响

杨显娟¹, 付尹¹, 王建^{1*}, 李红燕¹, 王立映¹, 王佳俊¹, 龚道银²

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

[摘要] 目的:研究不同剂量的单味黄连、厚朴及配伍对溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠的保护作用及结肠B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-3)及炎性细胞因子等表达的影响。方法:将120只健康成年SD大鼠随机分为空白组、模型组、柳氮磺胺吡啶组,黄连2.00,1.00,0.50 g·kg⁻¹组,厚朴2.00,1.00,0.50 g·kg⁻¹组,黄连-厚朴配伍4.00,2.00,1.00 g·kg⁻¹组,共12组,每组10只。采用2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇(TNBS/乙醇)制备UC模型,造模24 h后,均按10 mL·kg⁻¹灌胃,1次/d,并观察造模后各组大鼠的精神、活动状态、毛发光泽、大便性状和便血情况;连续给药6 d,末次给药24 h后取结肠组织和脾脏,计算结肠质量长度比和脾脏指数,根据结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分标准评价结肠损伤程度,采用苏木素-伊红(HE)染色进行组织病理学观察;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测空白组、模型组,优选的黄连2.00 g·kg⁻¹组,厚朴2.00 g·kg⁻¹组,黄连-厚朴配伍4.00 g·kg⁻¹组血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-10(IL-10),髓过氧化物酶(MPO)的表达量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠Bax,Caspase-3蛋白的表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠萎靡少动,结肠质量长度比、脾脏指数,CMDI,结肠组织病理损伤极显著增加,血清TNF- α ,IL-6,MPO的表达量极显著升高,而血清IL-10表达水平则极显著降低($P<0.01$);与模型组比较,柳氮磺胺吡啶组,黄连2.00,1.00 g·kg⁻¹,厚朴2.00 g·kg⁻¹,黄连-厚朴配伍3个剂量组大鼠结肠重量长度比,CMDI均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),黄连0.50 g·kg⁻¹组,厚朴0.50,1.00 g·kg⁻¹组结肠质量长度比,CMDI指数与模型组差异无统计学意义,与黄连、厚朴0.50 g·kg⁻¹组比较,黄连-厚朴配伍1.00 g·kg⁻¹组结肠质量长度比极显著降低($P<0.01$);与模型组比较,柳氮磺胺吡啶组,黄连2.00 g·kg⁻¹,黄连-厚朴配伍4.00 g·kg⁻¹组脾脏指数明显降低($P<0.05$);与模型组比较,柳氮磺胺吡啶组,黄连2.00,1.00 g·kg⁻¹,厚朴2.00 g·kg⁻¹,黄连-厚朴配伍3个剂量组可明显改善组织病理学损伤、组织坏死的深度和范围;与模型组比较,优选的黄连2.00 g·kg⁻¹组,厚朴2.00 g·kg⁻¹组,黄连-厚朴配伍4.00 g·kg⁻¹组血清TNF- α ,IL-6,MPO的表达水平显著降低,血清IL-10的水平显著升高($P<0.01$);与空白组比较,模型组结肠Bax,Caspase-3蛋白表达量显著升高($P<0.01$),与模型组比较,优选的黄连2.00 g·kg⁻¹组,厚朴2.00 g·kg⁻¹组,黄连-厚朴配伍4.00 g·kg⁻¹组结肠Bax,Caspase-3蛋白表达量显著降低($P<0.01$)。结论:单味黄连、厚朴及黄连-厚朴配伍可能通过下调Bax,Caspase-3蛋白的表达、抑制炎性细胞因子的释放和促进抗炎因子的释放而改善TNBS/乙醇诱导的UC模型大鼠的病理损伤,发挥保护结肠黏膜组织的作用,黄连与厚朴配伍效应有优于单味药、黄连有优于厚朴的趋势。

[关键词] 黄连;厚朴;2,4,6-三硝基苯磺酸;溃疡性结肠炎;炎性细胞因子

[中图分类号] R2-0;R289;R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0083-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202238

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200914.1427.004.html>

[网络出版日期] 2020-9-15 09:38

Protective Effect of Compatibility of Coptidis Rhizoma and Magnoliae Officinalis Cortex on Rat Model of Ulcerative Colitis and Influence of Apoptosis

YANG Xian-juan¹, FU Yin¹, WANG Jian^{1*}, LI Hong-yan¹, WANG Li-ying¹, WANG Jia-jun¹, GONG Dao-yin²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

[收稿日期] 20200526(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873023)

[第一作者] 杨显娟,在读硕士,从事中药药性理论与应用研究,E-mail:yangxianjuan@stu.cdutcm.edu.cn

[通信作者] *王建,教授,博士生导师,从事中药药性理论与应用研究,E-mail:jianwang08@163.com

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of different doses of single-flavored Coptidis, Magnoliae Officinalis Cortex, and their compatibility on ulcerative colitis (UC) model rats and the colonic B lymphoblastoma-2 associated X protein (Bax) and cysteine-containing aspartame-3 (Caspase-3) protein, inflammatory cytokines, and other expressions. **Method:** The 120 healthy adult SD rats were randomly divided into blank group, model group, sulfasalazine group, Coptidis Rhizoma 2.00, 1.00, 0.50 g·kg⁻¹ group, Magnoliae Officinalis Cortex 2.00, 1.00, 0.50 g·kg⁻¹ group, Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex 4.00, 2.00, 1.00 g·kg⁻¹ group, 12 groups with 10 rats in each group. The UC model was prepared by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid/ethanol (TNBS/ethanol). After 24 h of modeling, the rats were gavaged at 10 mL·kg⁻¹ for one time/d. After modeling, the mental state, activity state, hair luster, stool characteristics, and blood in the stool of each group were observed. After continuous administration for 6 days, colon tissues and spleen were taken after the last administration for 24 h. The ratio of colonic weight to length and spleen index was calculated. The degree of colonic injury was evaluated according to the colonic mucosal injury index (CMDI) score criteria. the histopathological observation was performed using hematoxylin-eosin staining (HE). The expression levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and myeloperoxidase (MPO) in the serum of Coptidis Rhizoma 2.00 g·kg⁻¹ group, Magnoliae Officinalis Cortex 2.00 g·kg⁻¹ group, Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex 4.00 g·kg⁻¹ were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in blank group and model group. Western blot was used to detect the expression of Bax and Caspase-3 proteins in the colon of rats. **Result:** Compared with blank group, rats in model group were sluggish and less active. The colon weight-length ratio, spleen index, CMDI, and colon tissue pathological damage increased significantly, and the expression of serum TNF- α , IL-6, and MPO increased significantly. Serum IL-10 expression levels were extremely significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, the sulfasalazine group, the Coptidis Rhizoma 2.00, 1.00 g·kg⁻¹ group, the Magnoliae Officinalis Cortex 2.00 g·kg⁻¹ group, and the three-dose groups of Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex, their colon weight-length ratio and CMDI were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The colon weight length ratio and CMDI index of the Coptidis Rhizoma 0.50 g·kg⁻¹ group, Magnoliae Officinalis Cortex 0.50 and 1.00 g·kg⁻¹ group were not significantly different from the model group but compared with Coptidis Rhizoma and Magnolia 0.50 g·kg⁻¹ group, the ratio of colon weight to length in the group of Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex 1.00 g·kg⁻¹ group was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, the spleen index of the sulfasalazine group, the Coptidis Rhizoma 2.00 g·kg⁻¹, and the Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex 4.00 g·kg⁻¹ group were significantly lower ($P < 0.05$), compared with model group, the sulfasalazine group, Coptidis Rhizoma 2.00, 1.00 g·kg⁻¹ and Magnoliae Officinalis Cortex 2.00 g·kg⁻¹, thre dose groups of Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex can significantly improve the depth and scope of histopathological damage and tissue necrosis. Compared with the model group, the preferred Coptidis Rhizoma 2.00 g·kg⁻¹ group, Magnoliae Officinalis Cortex 2.00 g·kg⁻¹ group, Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex 4.00 g·kg⁻¹ group serum TNF- α , IL-6, MPO expression levels are extremely significantly reduced, the level of IL-10 increased significantly ($P < 0.01$). Compared with blank group, the expression of Bax and Caspase-3 protein in the colon of model group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the expression of Bax and Caspase-3 protein in preferred Coptidis Rhizoma 2.00 g·kg⁻¹ group and Magnoliae Officinalis Cortex 2.00 g·kg⁻¹ group, Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex 4.00 g·kg⁻¹ group were significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion:** The compatibility of single-flavored Coptidis Rhizoma, Magnoliae Officinalis Cortex, and Coptidis Rhizoma combine with Magnoliae Officinalis Cortex may improve the pathology of UC model rats induced by TNBS/ethanol by down-regulating the expression of Bax and Caspase-3 protein, inhibiting the release of inflammatory cytokines and promoting the release of

anti-inflammatory factors injury, it plays a role in protecting colonic mucosa. The compatibility effect of *Coptidis Rhizoma* and *Magnoliae Officinalis Cortex* is better than that of single medicine, and *Coptidis Rhizoma* has a tendency to be better than *Magnoliae Officinalis Cortex*.

[Key words] *Coptidis Rhizoma*; *Magnoliae Officinalis Cortex*; 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid; ulcerative colitis; inflammatory cytokines

溃疡性结肠炎(UC)是一种非特异性炎症性疾病,主要位于大肠,以直肠和乙状结肠多见,病变呈弥漫性连续性分布,可逆行向近端结肠发展^[1]。临床常表现为黏液脓血便,腹痛、腹泻、里急后重,并伴有发烧和贫血等,具有病程长,迁延难愈,易复发的特点^[2]。流行病学调查显示UC没有性别区别,发病高峰年龄在30~40岁,且发病率及检出率在全球呈现明显上升的趋势^[3]。给社会生产力和公共医疗事业增添了沉重负担。

目前治疗UC的药物主要有5-氨基水杨酸,类固醇和免疫抑制剂等。由于中药在治疗UC上具有疗效显著、安全、副作用小和不易复发的特点,故成为了现代寻找治疗UC的热点。黄连具有清热燥湿,泻火解毒的功效,主治湿热痞满,呕吐吞酸,泻痢,黄疸等。《神农本草经》记载:黄连味苦、寒。主治热气,目痛,肠澼,腹痛,下痢,妇人阴中肿痛。但黄连大苦大寒,过服久服易伤脾胃。前期研究发现单味黄连能显著抑制小鼠胃动力而与厚朴配伍使用显著降低胃动力抑制又可发挥止泻作用^[4]。黄连-厚朴的配伍源自《普济方》卷一三三引《德生堂方》中的黄连厚朴汤。两药相合,寒热并用,并能相互制约药性,勿使过寒过热;共奏行气燥湿,平调寒热之功,是治疗胃肠寒热错杂症疾患的良药^[5],故临床使用黄连治疗疾病时常通过合理配伍、炮制等方法来降低毒副作用。但目前关于单味黄连、厚朴及黄连-厚朴配伍对UC的研究较少,因此黄连-厚朴配伍对UC保护作用的研究仍需探索。本实验通过平行研究探讨单味黄连、厚朴及黄连-厚朴配伍对UC的影响,为揭示中药配伍使用“相使增效”的科学内涵提供参考。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级SD大鼠,120只,雌雄各半,体质量(220±20)g。购于成都达硕实验动物有限公司,合格证号SCXK(川)2015-030。于成都中医药大学实验动物中心饲养,自由饮水及饮食,温度维持在(25±0.5)℃,湿度维持50%±5%,同时室内保持明暗交替周期为12h/12h,适应性饲养5d后开始实验。在成都中医药大学国家中医药管理局中药

药理三级科研实验室(TCM-09-315)进行实验操作,所有操作均符合成都中医药大学实验动物临床委员会批准,批准号TCM-2016-312。

1.2 药物 黄连购于成都荷花池中药材市场,经成都中医药大学李敏教授鉴定为黄连*Coptis chinensis*的干燥根茎,依据2015年版《中国药典》,经HPLC测得小檗碱含量为7.44%(以盐酸小檗碱计,含小檗碱不少于5.5%),符合2015年版《中国药典》规定。厚朴购于成都荷花池中药材市场,经成都中医药大学李敏教授鉴定为厚朴*Magnoliae Officinalis*或凹叶厚朴*Magnoliae Officinalis*的干燥干皮、枝皮及根皮,经HPLC测得厚朴酚与和厚朴酚的总含量为3.19%(厚朴酚与和厚朴酚的总量不少于2.0%),符合2015年版《中国药典》规定。

1.3 试剂 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(上海信宜天平药业,批号09180709);白细胞介素(IL)-6, IL-10, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(上海优选生物科技有限公司,批号均为202001);无水乙醇(成都市科隆化学品有限公司,批号201807170);苏木素染液,伊红染液(美国Thermo Fisher公司,批号分别为420699, 392155);兔抗B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax)多克隆抗体,兔抗半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-3)多克隆抗体(美国GeneTex公司,批号分别为GTX109683, GTX110543);兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Affinity公司,批号T0022)。

1.4 仪器 SQP型电子天平(德国赛多利斯公司);UPH-1-10T型优普超纯水制造系统(成都超纯科技公司);DG5032型酶标仪(南京华东电子集团);KQ5200E型超声仪(昆山市超声仪器公司);XD30型显微镜(宁波舜宇光学科技公司);ChemiDocMP凝胶成像系统,PowerPac型电泳仪(美国Bio-Rad公司);RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 药物制备 黄连-厚朴配伍药液参照郑新光^[6]的实验方法稍加改良进行提取。黄连剂量依据药典的规定用量5g,通过大鼠与人体表面积比换算并

结合预实验结果,确定以0.50,1.00,2.00 g·kg⁻¹ 3个剂量进行研究。为探讨黄连-厚朴配伍,厚朴设置剂量与黄连相同。

分别称取黄连、厚朴药材饮片各40 g,分别加400 mL(10倍量)纯净水浸泡30 min,置调温电炉上加热,沸腾后调至微沸状态,煎煮1 h,6层200目纱布过滤;滤渣加入纯净水360 mL(8倍量)煎煮1 h,6层200目纱布过滤,合并滤液转移至旋转蒸发仪中,黄连90℃浓缩到200 mL,厚朴60℃浓缩至200 mL,均相当于含原生药材0.20 g·mL⁻¹,置-20℃冷藏备用。用时按10 mL·kg⁻¹灌胃体积,稀释至相当于含原生药0.05,0.10,0.20 g·mL⁻¹(分别为0.50,1.00,2.00 g·kg⁻¹),制备成黄连水煎液和厚朴水煎液。称取黄连、厚朴药材饮片各40 g,用800 mL(10倍量)纯净水浸泡30 min,置调温电炉上加热,沸腾后调至微沸状态,煎煮1 h,6层200目纱布过滤;滤渣加入640 mL(8倍量)纯净水煎煮1 h,6层200目纱布过滤,合并滤液转移至旋转蒸发仪中,60℃浓缩至200 mL,相当于含原生药材0.40 g·mL⁻¹,置-20℃冷藏备用。用时按10 mL·kg⁻¹灌胃体积,稀释至相当于含原生药0.10,0.20,0.40 g·mL⁻¹(即1.00,2.00,4.00 g·kg⁻¹),制备成黄连-厚朴配伍水煎液。称取柳氮磺胺吡啶8 g置于200 mL无菌蒸馏水中,即得质量浓度0.04 g·mL⁻¹,制备成柳氮磺胺吡啶药液,放置于-20℃冷藏备用。将5%的TNBS水溶液与50%乙醇按1:1配制成TNBS/乙醇混合溶液。

2.2 动物分组、造模与给药 将健康SD大鼠120只,雌雄各半,按性别、体质量随机分为空白组,模型组,柳氮磺胺吡啶组,黄连2.00,1.00,0.50 g·kg⁻¹,厚朴2.00,1.00,0.50 g·kg⁻¹,黄连-厚朴配伍4.00,2.00,1.00 g·kg⁻¹组,共12组,每组10只。参照ZHU等^[7]造模法并进行改良。造模前,SD大鼠禁食不禁水24 h,麻醉后,用石蜡润滑0.2 mm直径的聚乙烯软管,插入直肠约7~8 cm,将造模液以1 mL·kg⁻¹缓慢注入直肠,再注入空气0.4 mL,防止药液停留在软管中,使大鼠倒立,保持肛门高位3 min,防止药物倒流,使TNBS/乙醇混合溶液注入后在直肠中均匀分布。空白组给予等体积的生理盐水进行灌肠,其余条件均与其他各组相同。

造模24 h后,均按10 mL·kg⁻¹灌胃给予黄连、厚朴及黄连-厚朴配伍各剂量组相应药液,柳氮磺胺吡啶组给予柳氮磺胺吡啶0.40 g·kg⁻¹,空白组与模型组灌胃给予等体积生理盐水,1次/d,连续6 d(灌胃

时间和操作人员固定)。

2.3 取材 大鼠末次给药后禁食不禁水24 h,麻醉,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心10 min,收集血清,-80℃保存,备用。解剖大鼠腹部,分离脾脏并用滤纸吸干,称质量。截取肛门至盲肠部位结肠,沿肠系膜纵轴剪开,用冰生理盐水洗净,观察黏膜损伤程度,评分,称质量并测量长度。将全结肠纵向平分为两份,一份置于4%多聚甲醛中进行固定,以备制作病理切片,观察结肠组织学损伤情况。另一份于-80℃保存,备用。

2.4 观察指标

2.4.1 大鼠一般情况 每天观察并记录各组大鼠的体质量、精神、活动状态、毛发光泽、大便性状和便血情况的变化,并记录死亡情况,一旦有大鼠死亡立即解剖查看。

2.4.2 结肠质量长度比 末次给药后,麻醉,沿腹白线剪开大鼠腹部。取出结肠并用冰生理盐水冲洗干净,用直尺测量结肠长度,然后称质量。结肠质量长度比=结肠质量(g)/结肠长度(cm)。

2.4.3 结肠黏膜损伤指数评价(CMDI) 分离结肠后,沿肠系膜纵轴剪开,用冰生理盐水将粪便及食物残渣洗净后,用滤纸吸干,平铺在方格纸上进行黏膜损伤指数评分^[8],0分,无损伤、充血;1分,局部黏膜充血水肿但无糜烂、溃疡形成;2分,有溃疡形成、充血,但炎症与溃疡仅显点状不显著;3分,在2分的基础上,黏膜溃疡、充血范围直径超过4 mm,炎症显著;4分,在3分的基础上,溃疡、充血、炎症更严重,并有结肠增厚现象;5分,在4分的基础上,溃疡面积直径超过1 cm,结肠明显充血、增厚;6分,在5分的基础上,溃疡形成超过2 cm,糜烂,结肠增厚。

2.4.4 脾脏指数 末次给药24 h后,麻醉,沿腹白线剪开大鼠腹部,分离脾脏,用滤纸吸干并称质量,计算脾脏指数。脾脏指数=脾质量/体质量×100%。

2.4.5 苏木素-伊红(HE)染色 观察大鼠结肠组织病理学变化 结肠组织置于4%多聚甲醛中固定48 h后,经过脱水、常规石蜡包埋、切片(厚度5 μm),并附于高粘附载玻片上,编号,37℃过夜,次日进行HE染色。在显微镜下观察结肠组织损伤变化。

2.4.6 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清TNF-α,IL-6,IL-10,MPO含量 末次给药后禁食不禁水24 h,麻醉后,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心10 min,离心半径为10 cm,收集血清,按照ELISA试剂盒说明书检测TNF-α,IL-6,IL-10,MPO的含量。

2.4.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠结肠 Bax, Caspase-3 蛋白表达 称取结肠, 研磨结肠组织, 按照试剂盒说明提取结肠蛋白, 取上清液, 根据蛋白样品 A, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。配置 12.5% SDS-PAGE 凝胶, 上样后进行电泳、转膜, TBST 封闭 1.5 h, 加入内参 β -actin (1:1 000), Bax 一抗 (1:1 000), Caspase-3 一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入相应二抗 (1:4 万), 37 °C 摇床孵育 1.5 h。洗膜 3 次后使用 ECL 法显色, 用 Image J 软件分析条带的灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白的灰度比值表示各蛋白相对表达量。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析。符合正态分布的计算资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析进行数据分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 空白组大鼠饮食正常, 毛发光泽, 活泼好动, 肛周干净。造模后大鼠毛发无光泽, 精神萎靡, 喜卧少动, 尿量增加, 倦卧拱背, 肛周

污秽, 垫料潮湿带血, 部分大鼠可见黏液血便现象, 表明造模成功。给予柳氮磺胺吡啶及各剂量黄连、厚朴、黄连-厚朴配伍药液后, 饮食情况、精神状态、粪便稀软程度、便血情况均有不同程度地好转。观察发现死亡大鼠体型消瘦, 腹大如鼓, 解剖后发现出现严重肠黏连, 肠梗阻, 盲肠胀气, 且结肠部位溃疡严重, 个别出现结肠糜烂现象。

3.2 对 UC 大鼠结肠重量长度比的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠重量长度比显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柳氮磺胺吡啶组, 黄连 2.00, 1.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 厚朴 2.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组及黄连-厚朴配伍 3 个剂量组的结肠重量长度比显著降低 ($P < 0.01$), 黄连 0.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 厚朴 1.00, 0.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组对结肠重量长度比无显著影响, 与模型组比较差异无统计学意义。与黄连-厚朴 0.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较, 黄连-厚朴配伍 1.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组结肠重量长度显著降低 ($P < 0.01$), 黄连-厚朴配伍后结肠重量长度比呈剂量依赖性降低, 以黄连-厚朴配伍 4.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组最优。见表 1。

表 1 黄连-厚朴配伍对 UC 大鼠结肠重量长度比, CMDI, 脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

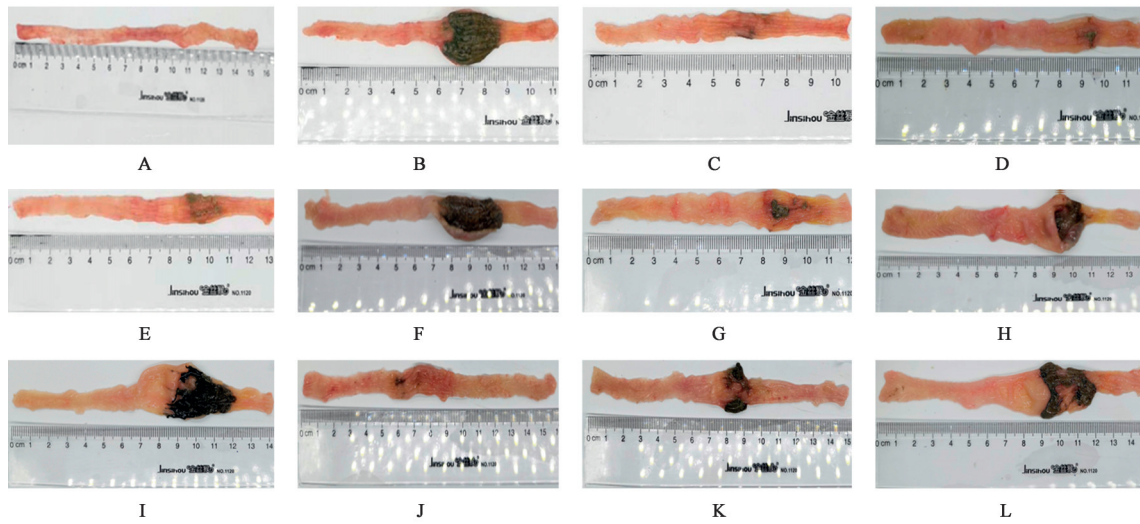
Table 1 Effect of compatibility of Coptidis Rhizoma and Magnoliae Officinalis Cortex on colon weight-length ratio, CMDI, and spleen index ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	结肠重量长度比/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-1}$	CMDI/分	脾脏指数/%
空白	-	9	0.09±0.02	0.22±0.44	0.18±0.04
模型	-	9	0.28±0.05 ¹⁾	5.78±0.44 ¹⁾	0.31±0.05 ¹⁾
柳氮磺胺吡啶	0.40	8	0.14±0.04 ³⁾	2.13±1.13 ³⁾	0.24±0.08 ³⁾
黄连	2.00	8	0.12±0.03 ³⁾	1.38±0.52 ³⁾	0.26±0.04 ²⁾
	1.00	7	0.12±0.04 ³⁾	1.43±0.79 ³⁾	0.29±0.04
	0.50	7	0.28±0.12	5.00±1.91	0.29±0.04
厚朴	2.00	8	0.14±0.03 ³⁾	4.13±1.81 ³⁾	0.26±0.04
	1.00	8	0.25±0.12	4.75±1.04	0.28±0.03
	0.50	7	0.26±0.09	5.43±0.53	0.27±0.06
黄连-厚朴配伍	4.00	8	0.12±0.05 ³⁾	1.75±1.04 ³⁾	0.26±0.04 ^{2,6)}
	2.00	7	0.13±0.02 ³⁾	1.86±1.21 ³⁾	0.28±0.04
	1.00	9	0.17±0.06 ^{3,4,5)}	4.44±1.31 ²⁾	0.29±0.07

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与黄连 0.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较⁴⁾ $P < 0.01$; 与厚朴 0.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较⁵⁾ $P < 0.01$; 与黄连-厚朴配伍组 1.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较⁶⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对 UC 大鼠结肠黏膜 CMDI 的影响 从结肠直观图发现, 与空白组比较, 模型组结肠出现严重溃疡、溃疡面积较大损伤严重; 与模型组比较, 柳氮磺胺吡啶组, 黄连 2.00, 1.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 厚朴 2.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组以及黄连-厚朴配伍 3 个剂量组, 溃疡面积较少, 结肠损伤较轻, 而黄连-厚朴 0.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组无明显变化。与空白组比较, 模型组 CMDI 评分显著升高,

差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柳氮磺胺吡啶组, 黄连 2.00, 1.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 厚朴 2.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组以及黄连-厚朴配伍 3 个剂量组 CMDI 均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 黄连-厚朴配伍后 CMDI 呈剂量依赖性, 以黄连-厚朴配伍 4.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组最优。其余各给药组与模型组比较, 差异无统计学意义。见表 1, 图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 柳氮磺胺吡啶组; D. 黄连 2.00 g·kg⁻¹组; E. 黄连 1.00 g·kg⁻¹组; F. 黄连 0.50 g·kg⁻¹组; G. 厚朴 2.00 g·kg⁻¹组; H. 厚朴 1.00 g·kg⁻¹组; I. 厚朴 0.50 g·kg⁻¹组; J. 黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组; K. 黄连-厚朴配伍 2.00 g·kg⁻¹组; L. 黄连-厚朴配伍 1.00 g·kg⁻¹组(图2同)

图1 黄连-厚朴配伍对UC大鼠结肠的影响

Fig. 1 Effect of Coptidis Rhizoma and Magnoliae Officinalis Cortex on colon of UC rats

3.4 对UC大鼠脾脏指数的影响 与空白组比较,模型组脾脏指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,柳氮磺胺吡啶组脾脏指数显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄连 2.00 g·kg⁻¹组,黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组的脾脏指数均明显降低($P<0.05$);黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组脾脏指数显著低于黄连-厚朴配伍 1.00 g·kg⁻¹组($P<0.01$)。黄连-厚朴配伍后脾脏指数呈剂量依赖性,且以黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组最优,而其余各给药组与模型组比较差异无统计学意义。见表1。

3.5 对UC大鼠结肠组织病理学改变的影响 空白组大鼠黏膜层、黏膜下层、肌层、浆膜层形态结构完整,固有腺体排列整齐、形态一致;与空白组比较模型组结肠溃疡形成,肠壁明显增厚,局部黏膜、黏膜下层及部分肌层组织凝固性坏死,坏死区域原有组织结构消失,组织疏松水肿伴充血出血改变,大量炎性细胞浸润,溃疡底部肉芽组织增生,周围残存腺体变形、隐窝炎、小脓肿。柳氮磺胺吡啶组,黄连 2.00, 1.00 g·kg⁻¹,厚朴 2.00 g·kg⁻¹,黄连-厚朴配伍 4.00, 2.00 g·kg⁻¹组均能显著改善结肠病理损伤,减轻组织坏死深度和范围、炎细胞、隐窝炎、隐窝小脓肿数量,炎性水肿和炎性充血出血,降低肉芽组织过度增生,胶原沉积。黄连、厚朴 0.50 g·kg⁻¹组对组织损伤无明显保护作用,而两者配伍黄连-厚朴配伍 1.00 g·kg⁻¹组可减轻组织坏死深度、范围和炎性细胞的浸润。见图2。

3.6 对UC大鼠炎性细胞因子的影响 基于药效研

究结果,优选出黄连 2.00 g·kg⁻¹,厚朴 2.00 g·kg⁻¹及黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组在单味药和配伍药中对TNBS/乙醇诱导的UC大鼠损伤发挥较优的保护作用,故重点检测了该组别大鼠的血清炎性细胞因子。与空白组比较,模型组TNF- α , IL-6, MPO的表达水平显著升高,而IL-10表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄连 2.00 g·kg⁻¹组,厚朴 2.00 g·kg⁻¹组和黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组TNF- α , IL-6和MPO的表达水平明显降低,而IL-10表达水平显著升高($P<0.01$)。见表2。

3.7 对UC大鼠结肠Bax, Caspase-3蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中Bax, Caspase-3蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连 2.00 g·kg⁻¹,厚朴 2.00 g·kg⁻¹和黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组Bax, Caspase-3蛋白表达显著降低($P<0.01$)。见图3,表3。

4 讨论

据流行病学统计,北美和北欧UC的发病率和患病率最高^[9]。但近年来,随着生活水平提高、饮食习惯的不断变化、生活压力的不断增加及临床诊断水平的不断提高,UC发病率在我国呈明显上升的趋势,已逐渐发展成为一种常见的消化系统疾病。黄连、厚朴在中医中常用于治疗胃肠道疾病,如肠癖、泄泻、痢疾等,而UC又可归属于中医中的泄泻范畴。课题组前期研究发现,黄连厚朴1:1配伍既能止泻,又可改善黄连抑制胃肠动力及泻痢伴随的腹胀,使黄连-厚朴配伍充分发挥了相使增效的

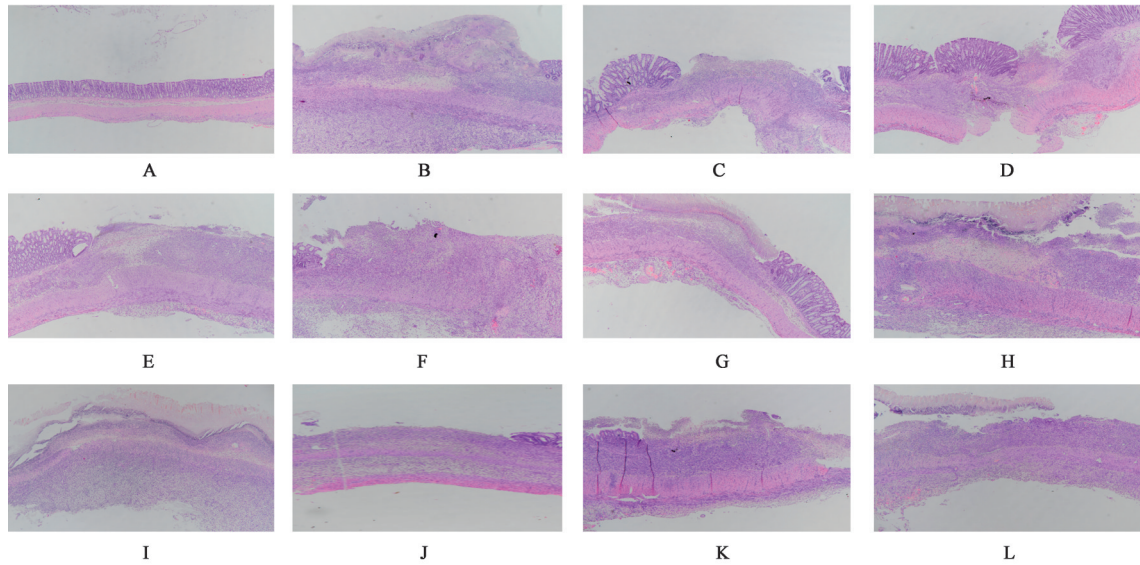


图2 黄连-厚朴配伍对UC大鼠结肠黏膜组织形态的影响(HE,×40)

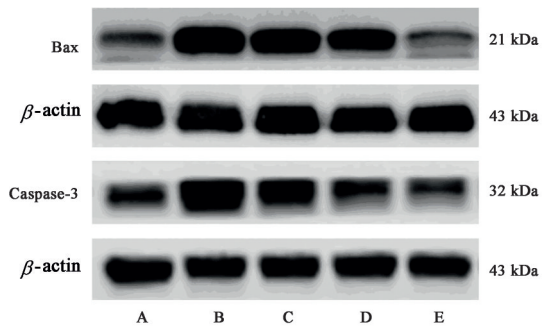
Fig. 2 Effect of Coptidis Rhizoma and Magnoliae Officinalis Cortex on morphology of colonic mucosa in UC rats (HE, ×40)

表2 黄连-厚朴配伍对UC大鼠血清炎症细胞因子的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Coptidis Rhizoma and Magnoliae Officinalis Cortex on serum inflammatory cytokines in UC rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	IL-10/ng·L ⁻¹	MPO/U·L ⁻¹
空白	-	9	259.28±23.90	27.99±2.73	66.08±3.40	297.01±28.74
模型	-	8	402.19±25.13 ¹⁾	47.67±3.90 ¹⁾	44.86±5.31 ¹⁾	508.54±41.58 ¹⁾
黄连	2.00	7	343.64±23.84 ²⁾	37.21±1.81 ²⁾	56.52±2.61 ²⁾	421.51±36.51 ²⁾
厚朴	2.00	8	337.43±25.76 ²⁾	38.27±2.97 ²⁾	55.22±4.12 ²⁾	434.26±43.41 ²⁾
黄连-厚朴配伍	4.00	8	284.46±20.87 ²⁾	32.99±2.99 ²⁾	61.50±4.54 ²⁾	332.89±24.11 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01(表3同)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 黄连 2.00 g·kg⁻¹组; D. 厚朴 2.00 g·kg⁻¹组; E. 黄连-厚朴配伍 4.00 g·kg⁻¹组

图3 大鼠结肠组织 Bax, Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Bax and Caspase-3 protein expression in rat colon tissue

作用^[6]。通过基因芯片筛选差异基因与核心基因预测到治疗UC的潜在中药有黄连、黄芩、厚朴等^[10]。现代研究也发现黄连厚朴中的主要有效成分可用于治疗溃疡性结肠炎,如黄连中的主要成分小檗碱可通过改善肠黏膜屏障功能^[11],抑制炎症反应^[12]和

表3 黄连-厚朴配伍对UC大鼠结肠组织 Bax, Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of compatibility of Coptidis Rhizoma and Magnoliae Officinalis Cortex on expression of Bax and Caspase-3 protein in colon tissue of UC rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
空白	-	0.18±0.07	0.80±0.20
模型	-	1.00±0.00 ¹⁾	1.82±0.73 ¹⁾
黄连	2.00	0.57±0.13 ²⁾	0.79±0.22 ²⁾
厚朴	2.00	0.51±0.14 ²⁾	0.59±0.15 ²⁾
黄连-厚朴配伍	4.00	0.13±0.05 ²⁾	0.57±0.15 ²⁾

氧化应激^[13],发挥其对UC的保护作用。巴马汀可以通过减轻结肠损伤,预防肠道菌群生态失调和调节色氨酸分解代谢来改善DSS诱导的UC^[14]。厚朴中的主要成分厚朴酚可通过调节核转录因子- κ B (NF- κ B)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)途径^[15],抑制TNF- α , IL-1 β 和IL-12的

表达发挥对UC的保护作用。

TNBS/乙醇是造成UC模型的常用方法之一^[16],能够很好的模拟UC疾病发病过程,症状和组织学改变与人类相似且操作过程简单,重复操作差别小,是评估治疗干预的合适实验模型。本研究采用TNBS/乙醇直肠内给药以结肠黏膜炎症为特征的大鼠结肠炎,其特征是溃疡、肠上皮损伤、免疫炎性细胞浸润和坏死^[17]。TNBS/乙醇诱导后,结肠增厚导致单位长度的质量增加^[18]。脾脏是重要的淋巴器官,内含大量的淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞,其大小变化可以间接反应体内免疫反应的情况。同时中医认为便血导致脾不统血使脾脏指数增加^[19],溃疡面积增加导致CMDI评分升高^[20]。本研究发现给予黄连、厚朴及黄连-厚朴配伍后,结肠重量长度比、脾脏指数和CMDI评分降低。同时在组织病理学研究发现,给予黄连、厚朴及黄连-厚朴配伍后可改善结肠的病理损伤,组织坏死深度和范围,炎性水肿和炎性充血出血减轻,炎性细胞的浸润减少。黄连-厚朴配伍后以4.00 g·kg⁻¹组(临床用量的4倍)对结肠重量长度比、脾脏指数和CMDI评分的增加抑制作用最优。值得注意的是单味黄连和厚朴的0.50 g·kg⁻¹组,均未呈现改善溃疡性结肠炎的效应,而二者同剂量配伍1.00 g·kg⁻¹组则能明显降低结肠重量长度比、溃疡面积及结肠组织病理损伤。总而言之,综合药效实验结果,同剂量的黄连-厚朴配伍有优于单味药物使用的趋势,体现出中药配伍增效的特点;且配伍联用,单味黄连发挥着主要作用,有优于厚朴的趋势。

UC基本病变特点是固有膜层内弥漫性淋巴细胞、浆细胞、单核细胞等炎细胞浸润,此外还有大量中性粒细胞和嗜酸性细胞浸润,引起肠黏膜及黏膜下组织发生炎症反应^[21]。机体免疫细胞产生的细胞因子可透过肠上皮屏障进入体内导致免疫系统紊乱,可分为抑炎因子如IL-4, IL-5, IL-10,以及促炎因子如IL-6, TNF- α , IL-2,两者关系失衡是导致炎症反应发生的重要因素^[22],因此调节免疫系统达到动态平衡对治疗UC具有重要的意义。本实验模型组大鼠IL-6, TNF- α 含量显著升高,IL-10含量显著降低,该结果与相关报道一致^[23]。而黄连、厚朴2.00 g·kg⁻¹组及黄连-厚朴配伍4.00 g·kg⁻¹组可有效抑制IL-6, TNF- α 的表达并促进IL-10的表达。MPO是一种血红素蛋白,富含于中性粒细胞中,为中性粒细胞浸润的标志,研究发现,模型组MPO含量显著高于空白组,而与模型组比较,黄连、厚朴

2.00 g·kg⁻¹组及黄连-厚朴配伍4.00 g·kg⁻¹组MPO含量显著降低。细胞凋亡是正常细胞在生理或病理刺激下后出现的一种自发进行的死亡,是机体维持自身稳定的一种基本生理机制。Bax是促凋亡成员,其机理是释放细胞色素C从线粒体释放入胞质,从而导致Caspase-9和Caspase-3级联激活所介导的细胞凋亡。实验中发现,黄连、厚朴2.00 g·kg⁻¹组及黄连-厚朴配伍4.00 g·kg⁻¹组Bax, Caspase-3蛋白表达明显低于模型组。提示黄连-厚朴配伍对UC模型大鼠的作用可能与Bax, Caspase-3蛋白介导的细胞凋亡有关。

综上所述,单味黄连、厚朴以及黄连-厚朴配伍通过抑制结肠增厚,降低脾脏指数,减少溃疡面积,改善结肠组织病理损伤、调节炎性细胞因子表达和降低Bax, Caspase-3蛋白表达,从而有效改善溃疡性结肠炎,并呈剂量依赖性,推测黄连配伍厚朴对TNBS/乙醇诱导的UC模型大鼠的改善作用通过下调Bax, Caspase-3蛋白表达和抑制炎性细胞因子促进促炎细胞因子释放发挥对结肠黏膜组织的保护作用。黄连与厚朴配伍效应有优于单味药的趋势,黄连有优于厚朴的趋势,且与各药用量密切相关。本研究仅对黄连配伍厚朴抗UC的作用进行了初步探讨,但其潜在的作用机制还需要深层次研究。

[参考文献]

- [1] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis[J]. The Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [2] EISENSTEIN M. Ulcerative colitis: towards remission [J]. Nature, 2018, 563(7730): S33-S33.
- [3] EISENSTEIN M. Refractory ulcerative proctitis: how to treat it? [J]. Nature, 2018, doi: 10.1016/j.bpg. 2018. 05. 009.
- [4] 郑新光,傅勇,王建,等. 黄连配厚朴对小鼠胃肠动力及止泻作用的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1585-1587.
- [5] 孟斌,张振秋,黄连与厚朴配伍对盐酸小檗碱在大鼠体内药动学的影响[J]. 中成药, 2009, 31(6): 943-945.
- [6] 郑新光. 黄连配厚朴减副存效及部分机制研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2014.
- [7] ZHU L, LU M D, HONG S, et al. Qing Chang Hua Shi granule ameliorate inflammation in experimental rats and cell model of ulcerative colitis through MEK/ERK signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116:108967.

- [8] 林汉杰,韩凌. 四君子汤对 TNBS 诱导的 UC 大鼠结肠紧密连接蛋白表达的影响研究[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [9] ORDÁS I, ECKMANN L, TALAMINI M, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [10] 胡宗仁,郑文江,严倩,等. 溃疡性结肠炎差异表达基因及中药预测的生物信息学分析[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(7):1684-1690.
- [11] YU X T, XU Y F, HUANG Y F, et al. Berberubine attenuates mucosal lesions and inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3):e0194069.
- [12] LI C, XI Y, LI S, et al. Berberine ameliorates TNBS induced colitis by inhibiting inflammatory responses and Th1/Th17 differentiation[J]. *Mol Immunol*, 2015, 67(2):444-454.
- [13] DKHIL M A, METWALY M S, AL-QURAI SHY S. Berberine improves the intestinal antioxidant status of laboratory mice, *Mus musculus*[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2017, 24(7): 1567-1573.
- [14] ZHANG X J, YUAN Z W, QU C, et al. Palmatine ameliorated murine colitis by suppressing tryptophan metabolism and regulating gut microbiota [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 137:34-46.
- [15] SHEN P, ZHANG Z, HE Y, et al. Magnolol treatment attenuates dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis by regulating inflammation and mucosal damage[J]. *Life Sci*, 2018, 196:69-76.
- [16] 祁向争,刘洁. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2010, 29(4):220-222.
- [17] CHAMANARA M, RASHIDIAN A, MEHR S E, et al. Melatonin ameliorates TNBS-induced colitis in rats through the melatonin receptors: involvement of TLR4/MyD88/NF- κ B signalling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(2):361-371.
- [18] LOPES DE OLIVEIRA G A, ALARCÓN DE LA LASTRA C, ROSILLO M Á, et al. Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats is associated with inflammatory mediators inhibition and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 297: 25-33.
- [19] SOUBH A A, ABDALLAH D M, EL-ABHAR H S. Geraniol ameliorates TNBS-induced colitis: Involvement of Wnt/ β -catenin, p38 MAPK, NF- κ B, and PPAR γ signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2015, 136:142-150.
- [20] 葛飞,孙志广. 金荞麦对溃疡性结肠炎的抗炎作用及机制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2016.
- [21] 陈冠儒,张怡. 芪附理中灌肠方对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-8、IL-10 及肠黏膜 ICAM-1 表达的影响[D]. 成都:成都中医药大学,2018.
- [22] 乔翠霞,曾莉. 溃愈散调控 TLR4/MyD88/NF- κ B p65 信号通路治疗溃疡性结肠炎的机制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2019.
- [23] SHI L, DAI Y, JIA B, et al. The inhibitory effects of Qingchang Wenzhong granule on the interactive network of inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6):9979-9991.

[责任编辑 孙丛丛]