

# 四逆散对溃疡性结肠炎大鼠 ICAM-1 和 VCAM-1 的影响

卢健, 王凌志, 马骥, 范颖\*, 林庶茹  
(辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:探讨四逆散对实验性溃疡性结肠炎(UC)大鼠细胞间黏附分子(ICAM)-1和血管内皮细胞黏附分子(VCAM)-1的影响,以及君臣配伍在组方中的作用。方法:SD大鼠50只,分为5组,即正常组、模型组、四逆散组、柴芍枳组和柴芍组;采用免疫法造模,用家兔新鲜结肠黏膜制备抗原乳化液,分别于造模第1,10,17,24天注射于大鼠的双侧足跖、腹股沟及背部皮内,造模第2天分组给药,正常组与模型组按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蒸馏水ig;四逆散组按照 $1.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 四逆散溶液ig;柴芍枳组按照 $1.31\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig;柴芍组按照 $0.88\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig;第29天给药后,取材,处死大鼠;采用双抗体夹心ELISA法检测大鼠血清及结肠黏膜组织ICAM-1和VCAM-1水平。结果:模型组大鼠血清ICAM-1( $64.60\pm 4.81$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 明显高于正常组( $42.35\pm 3.02$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $P<0.05$ ;VCAM-1( $0.29\pm 0.01$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著高于正常组( $0.20\pm 0.02$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $P<0.05$ ;模型组大鼠结肠黏膜组织VCAM-1( $1.82\pm 0.19$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 显著高于正常组( $1.29\pm 0.10$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , $P<0.05$ ;经灌服四逆散后,实验大鼠血清ICAM-1( $53.87\pm 2.60$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、VCAM-1( $0.22\pm 0.01$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,结肠黏膜组织VCAM-1( $1.41\pm 0.08$ ) $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 含量均较模型组显著降低, $P<0.05$ 。结论:四逆散能够抑制UC大鼠炎性细胞浸润,减轻炎症反应,其作用机制可能与抑制实验大鼠ICAM-1和VCAM-1的表达有关,方中发挥主要作用的药物可能为柴胡、枳实和芍药。

**[关键词]** 四逆散; 细胞间黏附分子-1; 血管内皮细胞黏附分子-1; 溃疡性结肠炎

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0208-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013200208

## Influence of Sinisan on ICAM-1 and VCAM-1 in Experimental Ulcerative Colitis Rats

LU Jian, WANG Ling-zhi, MA Ji, FAN Ying\*, LIN Shu-ru

(Prescription Subject of Liaoning Traditional Chinese Medicine University, Shenyang 110032, China)

**[收稿日期]** 20130130(003)

**[基金项目]** 辽宁省教育厅项目(2006T094)

**[第一作者]** 卢健,博士,副教授,从事方剂效用机制研究,Tel:024-31207085,E-mail:juioo@sina.com

**[通讯作者]** \*范颖,教授,博士生导师,从事方剂学研究,Tel:024-31207104

[10] 李昕,宫泽辉,刘克良.酪氨酸蛋白激酶与突触可塑性及学习记忆的关系[J].中国药理学通报,2005,21(2):141.

[11] Longo B M, Sanabria E R, Gabriel S, et al. Electrophysiological abnormalities of the hippocampus in the pilocarpine/cycloheximide model of chronic spontaneous seizures [J]. J Epilepsia, 2002, 43(5): 203.

[12] Zhao Chun Mei, Deng Wei, Gage F H. Mechanisms and functional implications of adult neuro genesis [J]. J Cell, 2008, 132(4): 645.

[13] Singh K K, Park K J, Hong E J. Developmental axon

pruning mediated by BDNF-P75NTR-dependent axon degeneration [J]. J Nat Neurosci, 2008, 11(6): 649.

[14] Griesmaier E, Schlager G, Wegleiter K. Role of P75NTR in NMDAR-mediated excitotoxic brain injury in neonatal mice [J]. J Brain Res, 2010, 8(1355): 31.

[15] 马岱朝,陈卫银,李红刚,等.参芎滴丸对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经可塑性的影响[J].中成药,2012,34(5):814.

[责任编辑 聂淑琴]

**[ Abstract ] Objective:** To study Sinisan on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental (UC) rats. **Method:** The animals were divided into 5 groups, including the normal group, model group, Sini powder group, Chaishaozhi group and Chaishao group. The antigen emulsion made by fresh rabbit colonic mucosa were injected into the rats' bilateral paws, groins and backs in 1st, 10th, 17th, 24th day to induce model. The normal group and model group were given with 10 mL·kg<sup>-1</sup> distilled water; and Sinisan group was treated with 1.75 g·kg<sup>-1</sup> Sinisan solution; and Chaishaozhi group was treated with Chaishaozhi 1.31 g·kg<sup>-1</sup> Chaishaozhi solution; and Chaishao group was treated with with 0.88 g·kg<sup>-1</sup> Chaishao solution. On the 29th day, the rats were sacrificed and drawn. ICAM-1 and VCAM-1 levels were detected with ELISA. **Result:** ICAM-1 levels in blood of model group (64.60 ± 4.81) μg·L<sup>-1</sup> were higher than normal group (42.35 ± 3.02) μg·L<sup>-1</sup>, *P* < 0.05, and VCAM-1 levels (0.29 ± 0.01) μg·L<sup>-1</sup> higher than normal (0.20 ± 0.02) μg·L<sup>-1</sup>, *P* < 0.05. VCAM-1 levels in colon mucosal tissue of model group (1.82 ± 0.19) μg·mg<sup>-1</sup> higher than normal group (1.29 ± 0.10) μg·mg<sup>-1</sup>, *P* < 0.05. Sini san could significantly reduce ICAM-1 (53.87 ± 2.60) μg·L<sup>-1</sup>, VCAM-1 (0.22 ± 0.01) μg·L<sup>-1</sup> levels in blood, and VCAM-1 (1.41 ± 0.08) μg·mg<sup>-1</sup> in colon mucosal tissue, *P* < 0.05. **Conclusion:** The mechanism of intervening experimental UC by Sinisan is related to the balance of cytokine network.

**[ Key words ]** Sinisan; ICAM-1; VCAM-1; ulcerative colitis

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 以腹泻、黏液脓血便、里急后重为主要临床表现,其病因及发病机制目前尚不明确,大多数医家认为与遗传、免疫、环境因素等密切相关。大量的临床与实验研究也表明,免疫反应异常是导致 UC 发病的关键因素之一<sup>[1]</sup>。本课题组通过前期对四逆散不同配伍干预实验性 UC 的效用研究,结果发现四逆散能够干预实验性 UC,调控 UC 实验大鼠细胞因子网络<sup>[2-3]</sup>,以四逆散全方、柴枳芍配伍与柴芍配伍作用最为理想<sup>[4]</sup>。本实验在此基础上,进一步探讨四逆散对实验性 UC 大鼠细胞间黏附分子 (ICAM)-1 和血管内皮细胞黏附分子 (VCAM)-1 的影响,以期探究四逆散干预 UC 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 四逆散由柴胡、芍药、枳实、甘草以 1:1:1:1 比例组成。柴胡免煎颗粒 (0909165)、芍药免煎颗粒 (0909053)、枳实免煎颗粒 (0909086)、甘草免煎颗粒 (0909050) 均购自江苏省江阴天江药业有限公司。

**1.2 动物** 健康 SD 大鼠, SPF 级, 50 只, 雌雄各半, 体重 160 ~ 190 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 许可证编号 SCXK (沪) 2008-0016。

**1.3 试剂** 蛋白标准液、考马斯亮蓝溶液 (批号 20090825, 南京建成生物工程公司), 完全福氏佐剂 (批号 096K89031, 美国 Sigma 公司), 大鼠血管内皮细胞黏附分子 1 (VCAM-1/CD106 ELISA 试剂盒, 批号 20100813B1)、大鼠细胞间黏附分子 1 (ICAM-1/

CD54, ELISA 试剂盒, 批号 20100816B1), 购自北京邦定生物医学公司。

**1.4 仪器与设备** 550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), TDL-5-A 型离心机 (飞鸽牌 Anke, 上海安亭科学仪器厂), WS2-261-79 型电热恒温水浴箱 (北京长安科学仪器厂), DY89-II 型电动玻璃匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 根据前期实验研究结果<sup>[4]</sup>, 将实验动物分为 5 组: 正常组、模型组、四逆散组、柴芍枳组和柴芍组, 每组 10 只, 各组体重经统计学比较无显著差异。

**2.2 造模与给药** 采用免疫法造模<sup>[5]</sup>。刮取家兔新鲜结肠黏膜制成组织匀浆, 取上清液提纯, 用 Lowry 法测定蛋白质含量 (24.28 g·L<sup>-1</sup>), 冷藏备用。使用时与等量完全福氏佐剂充分混匀, 制成抗原乳化液。于造模第 1 天注射抗原乳化液, 分别于大鼠的双侧足跖、腹股沟及背部进行皮内注射; 第 10, 17, 24 天依同法注射。按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 分别配制药物, 于造模第 2 天开始分组 ig。正常组与模型组按照 10 mL·kg<sup>-1</sup> 蒸馏水 ig; 四逆散组按照 1.75 g·kg<sup>-1</sup> 四逆散溶液 ig; 柴芍枳组: 按照 1.31 g·kg<sup>-1</sup> ig; 柴芍组按照 0.88 g·kg<sup>-1</sup> ig。于第 29 天 ig 后, 称重, 取血, 待侧指标; 处死, 自肛门上约 2 ~ 8 cm 处剖取结肠, 固定, 做病理切片, HE 染色, 镜下观察。

**2.3 指标检测** 分别于给药前后测量实验大鼠体重, 计算给药前后平均增长 [给药前后体重平均增

长 = [(给药后体重 - 给药前体重) / n]; 每周测量实验大鼠体重, 监测体重变化情况。

**2.3.1 大鼠结肠黏膜组织 ICAM-1 和 VCAM-1 的测定** 采用双抗体夹心 ELISA 法测定, 严格按试剂盒要求操作。取出大鼠结肠黏膜组织, 加组织提取液 10 倍稀释、混匀; 取出酶标板, 依照次序对应分别加 50 μL 对照品于空白微孔中; 标记样品编号, 加 50 μL 样品于空白微孔中; 在样品孔中加 10 μL 生物素标记液; 在对照品孔和样品孔中加 100 μL 的酶标记溶液; 36.3 °C 孵育反应 65 min; 手工洗板 6 次, 每次静置 25 s; 每孔加底物 A, B 液各 50 μL; 37.3 °C 避光孵育反应 15 min; 每孔加 50 μL 终止液, 终止反应 6 min; 检测, 采集数据。

**2.3.2 血清 ICAM-1 和 VCAM-1 的测定** 取出大鼠血清; 在酶标板依照次序对应分别加 100 μL 的对照品于空白微孔中; 标记编号, 加 100 μL 样品于空白微孔中; 在对照品孔和样品孔中加 50 μL 酶标记溶液; 36.2 °C 孵育反应 60 min; 余操作同 2.3.1。

**2.4 统计处理** 采用统计软件 SPSS 10.0 处理, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用单因素方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 结肠组织病理改变** 模型组大鼠病变结肠黏膜表面可见溃疡, 个别深达肌层, 炎症反应较重, 有充血、糜烂, 中性粒细胞浸润, 黏膜上皮部分缺失, 局部固有层腺体减少, 黏膜下层血管增生, 黏膜肌层不明显。其余各组均有不同程度的病变。见图 1。

**3.2 对实验性 UC 大鼠体重的影响** 给药前后正常组大鼠体重平均增长 54%, 而其他各组大鼠体重平均增长 32% ~ 38%; 比较各组大鼠每周体重变化情况, 见表 1。

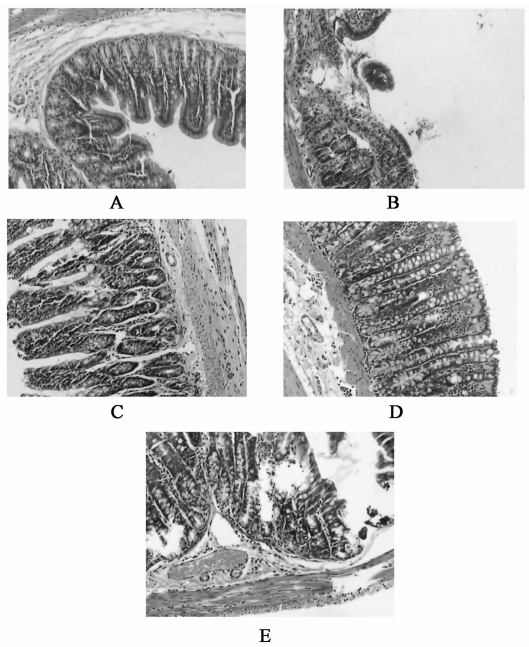
表 1 四逆散对实验性 UC 大鼠体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) g

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	每周体重增长	给药前后体重增长
正常	-	31.10 ± 15.19	93.30 ± 45.57
模型	-	18.38 ± 10.76 <sup>1)</sup>	62.10 ± 36.65 <sup>1)</sup>
四逆散	1.75	19.10 ± 12.27	57.30 ± 36.81
柴芍枳	1.31	20.47 ± 11.33	61.40 ± 33.97
柴芍	0.88	21.33 ± 12.06	64.00 ± 36.18

注: 与正常组比较<sup>1)</sup> P < 0.05; 与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05; 与四逆散组比较<sup>3)</sup> P < 0.05; 与柴芍枳组比较<sup>4)</sup> P < 0.05 (表 2 ~ 3 同)。

### 3.3 对实验性 UC 大鼠 ICAM-1 的影响

**3.3.1 对实验性 UC 大鼠结肠黏膜组织 ICAM-1 的影响** 与正常组比较, 除柴芍枳组外, 各组均呈现升



A. 正常组; B. 模型组; C. 四逆散 1.75 g·kg<sup>-1</sup> 组; D. 柴芍枳 1.31 g·kg<sup>-1</sup>; E. 柴芍 0.88 g·kg<sup>-1</sup> 组

图 1 四逆散对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理改变的影响 (HE, × 100)

高趋势; 各组间比较, 除柴芍枳组实验大鼠结肠黏膜组织 ICAM-1 的含量明显低于柴芍组外, 各组之间无显著性差异。见表 2。

**3.3.2 对实验性 UC 大鼠血清 ICAM-1 的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠血清 ICAM-1 的含量明显升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 各给药组均显著减少 (P < 0.05); 与四逆散组比较, 柴芍枳组、柴芍组均显著低于四逆散组 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 四逆散对实验性 UC 大鼠 ICAM-1 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ICAM-1	
		结肠黏膜组织 /μg·mg <sup>-1</sup>	血清 /μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	1.13 ± 0.09	42.35 ± 3.02
模型	-	1.18 ± 0.05	64.60 ± 4.81 <sup>1)</sup>
四逆散	1.75	1.19 ± 0.17	53.87 ± 2.60 <sup>2)</sup>
柴芍枳	1.31	1.10 ± 0.07	49.53 ± 4.03 <sup>2,3)</sup>
柴芍	0.88	1.22 ± 0.13 <sup>4)</sup>	49.91 ± 4.23 <sup>2,3)</sup>

### 3.4 对实验性溃疡性结肠炎大鼠 VCAM-1 的影响

**3.4.1 对结肠黏膜组织 VCAM-1 的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠结肠黏膜组织 VCAM-1 的含量明显高于正常组 (P < 0.05); 与模型组比较, 各给药组均显著降低 (P < 0.05); 四逆散组、柴芍枳组和柴芍组之间比较, 无显著性差异。见表 3。

**3.4.2 对实验性溃疡性结肠炎大鼠血清 VCAM-1**

的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清 VCAM-1 的含量明显高于正常组( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组均显著降低( $P < 0.05$ );四逆散组、柴芍枳组和柴芍组之间比较,无显著性差异。见表 3。

表 3 四逆散对实验性 UC 大鼠 VCAM-1 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	VCAM-1	
		结肠黏膜组织 /μg·mg <sup>-1</sup>	血清 /μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	1.29 ± 0.10	0.20 ± 0.02
模型	-	1.82 ± 0.19 <sup>1)</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>1)</sup>
四逆散	1.75	1.41 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>2)</sup>
柴芍枳	1.31	1.39 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>2)</sup>
柴芍	0.88	1.42 ± 0.13 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

大量的临床与实验研究表明,UC 患者结肠黏膜常伴有活动性炎症,炎症细胞从微循环迁移到病变组织是炎症发生的关键环节。ICAM-1 广泛分布于上皮细胞、血管内皮细胞、淋巴细胞等,能够介导中性粒细胞、单核细胞在内皮细胞上的滚动和黏附<sup>[6]</sup>。生理情况下,ICAM-1 呈低表达状态;当有炎症存在,ICAM-1 在细胞因子的作用下表达增强,参与炎症和免疫反应。VCAM-1 出现的较晚,可表达于经细胞因子活化的内皮细胞表面,参与单核巨噬细胞和淋巴细胞向炎症部位的浸润。有研究表明,UC 患者肠黏膜组织<sup>[7-8]</sup>和外周血<sup>[9-10]</sup> ICAM-1 和 VCAM-1 表达均明显升高。

本实验结果表明,四逆散能够降低实验大鼠血清 ICAM-1 的含量( $P < 0.05$ ),但对结肠黏膜组织 ICAM-1 的影响并不明显;方中君臣药物柴胡与白芍的配伍与四逆散作用相近;配伍枳实后,则能明显降低实验大鼠结肠黏膜组织 ICAM-1 的含量( $P < 0.05$ ),此结果有待于进一步研究,以探讨枳实在四逆散中的配伍作用。同时,四逆散也能降低实验大鼠结肠黏膜组织和血清中 VCAM-1 的含量( $P <$

0.05),方中柴胡与芍药的配伍效果并不理想(柴芍组实验大鼠结肠黏膜组织 VCAM-1 的含量明显高于正常组, $P < 0.05$ )。由此可以推断,四逆散能够抑制 UC 大鼠炎性细胞浸润,减轻炎症反应,其作用机制可能与抑制实验大鼠 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达有关,方中发挥主要作用的药物可能为柴胡、枳实和芍药。

#### [参考文献]

- [1] Vedat Goral, Tahir Celenk, Abdurahman Kaplan, et al. Plasma cytokine levels in ulcerative colitis[J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54 (76):1130.
- [2] 卢健,范颖,马骥,等.四逆散对实验性溃疡性结肠炎细胞因子 mRNA 表达的影响[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(8):83.
- [3] 卢健,范颖,王丽娜,等.四逆散调控实验性溃疡性结肠炎大鼠细胞因子网络的实验研究[J].微循环学杂志,2012,22(2):89.
- [4] 卢健,范颖,马骥,等.四逆散及不同配伍干预溃疡性结肠炎的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):109.
- [5] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1335.
- [6] Nielsen O H, Kirman I, Rudiger N, et al. Upregulation of interleukin-12 and-17 in active inflammatory bowel disease[J]. Scand J Gastroenterol, 2003, 38(2):180.
- [7] 陈文敏,江琼,石永江.川芎嗪对实验性结肠炎 ICAM-1 表达的影响[J].中成药,2012,34(1):159.
- [8] 韩英,李世荣.溃疡性结肠炎治疗的新进展及新策略[J].世界华人消化杂志,2000,8(11):1273.
- [9] 张珺,赵清喜.肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白介素 8 和细胞间黏附分子 1 在溃疡性结肠炎患者外周血中的表达及其临床意义[J].社区医学杂志,2007,5(19):10.
- [10] 陈文敏,江琼.川芎嗪对结肠炎模型小鼠血管细胞黏附分子-1 表达的影响[J].中国生物制品学杂志,2012,25(2):200.

[责任编辑 聂淑琴]