

# 兰茵凤扬化浊解毒方 对溃疡性结肠炎大鼠免疫调控机制的影响

张纨<sup>1</sup>, 王志坤<sup>1</sup>, 董林林<sup>2</sup>, 李博林<sup>2</sup>, 吴云楚<sup>2</sup>, 刘启泉<sup>1\*</sup>

(1. 河北省中医院, 石家庄 050011; 2. 河北医科大学研究生院 2010 级, 石家庄 050011)

**[摘要]** 目的: 观察兰茵凤扬化浊解毒方对溃疡性结肠炎(UC)大鼠 CD4<sup>+</sup>-T 淋巴细胞(CD4<sup>+</sup>)/CD29<sup>+</sup>-T 淋巴细胞(CD29<sup>+</sup>)、白细胞介素-8(IL-8)及白细胞介素-10(IL-10)表达的影响,以探讨其作用机制。方法:将 60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 5 组,每组 12 只,分别为正常组、模型组、兰茵凤扬化浊解毒方高剂量组、低剂量组(20.0, 5.0 g·kg<sup>-1</sup>)、柳氮磺胺吡啶对照组(SPAP 0.3 g·kg<sup>-1</sup>组)。采用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇法诱导溃疡性结肠炎模型,造模成功后分别 ig 给予相应的药物,连续 14 d,观察各组大鼠一般情况以及疾病活动指数(DAI)评分、组织病理学、CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>, IL-8, IL-10 变化情况。结果:DAI 评分:与正常组比较,其余各组均升高;与模型组比较,兰茵凤扬高、低剂量组均减低,结果均有统计学意义( $P < 0.05$ )。CD4<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>:与模型组相比,对照组、中药高、低剂量组均降低,结果有统计学意义( $P < 0.05$ )。IL-8:与模型组相比,对照组、中药高、低剂量组均减低( $P < 0.05$ ),而中药低剂量组与对照组比较无差异。IL-10:与模型组相比,中药高、低剂量组、对照组均升高( $P < 0.05$ )。结论:兰茵凤扬化浊解毒方可上调抑炎症因子、下调促炎症因子和抑制 CD4<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> 的表达。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎; 兰茵凤扬化浊解毒方; 白细胞介素-8; 白细胞介素-10; T 细胞亚群

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0236-04

## Effect of Lanyin Fengyang Huazhuo Jiedu Prescription on Immune Regulation Mechanism in Rats with Ulcerative Colitis

ZHANG Wan<sup>1</sup>, WANG Zhi-kun<sup>1</sup>, DONG Lin-lin<sup>2</sup>, LI Bo-lin<sup>2</sup>, WU Yun-chu<sup>2</sup>, LIU Qi-quan<sup>1\*</sup>

(1. Chinese Medicine Hospital in Heibei Province, Shijiazhuang 050011, China;

2. Hebei Medical University Graduate School 2010, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Lanyin Fengyang Huazhuo Jiedu prescription on expressions of CD4<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>, IL-8 and IL-10 in rats with ulcerative colitis. **Method:** Sixty healthy male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: the normal group (NG), model control group (MG), high-dose group of Lanyin Fengyang Huazhuo Jiedu decoction (HDG, 20.0 g·kg<sup>-1</sup>), low-dose group of Lanyin Fengyang Huazhuo Jiedu decoction (LDG, 5.0 g·kg<sup>-1</sup>) and the sulfasalazine group (SPAP 0.3 g·kg<sup>-1</sup>), 12 rats in every group. Trinitrobenzenesu l-fonicacid/ethanol (TNBs/ethanol) was used to induce ulceratvie colitis. After successful modeling, continuous treatment lasted 14 days. The rat's general state, disease activity index (DAI) scores, colonic pathological morphology change of T-lymphocyte cytokines IL-8 and IL-10 were observed. **Result:** DAI scores: compared with NG, the scores of other groups were elevated. compared with the MG, the scores of HDG and LDG were reduced. The result showed statistical significance ( $P < 0.05$ ). CD4<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>: compared with the MG, the levels of NG, HDG and LDG were reduced. The result showed statistical significance ( $P < 0.05$ ). IL-8: compared with the MG, the levels of NG, HDG and LDG were reduced ( $P < 0.05$ ). There was no

**[收稿日期]** 20120620(013)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局科研计划项目(2009015);河北省中医药管理局溃疡性结肠炎浊毒证研究室课题

**[第一作者]** 张纨, 博士, 主治医师, 从事脾胃病临床与科研, Tel: 13780300915, E-mail: iconwhet9732@sina.com

**[通讯作者]** \* 刘启泉, 教授, 主任医师, 从事脾胃病临床与科研, Tel: 13785209065, E-mail: liuqq1015@sina.com

difference between the levels of LDG and SG. IL-10; compared with the MG, the levels of SPAP, HDG and LDG were elevated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Lanyin Fengyang Huazhuo Jiedu decoction can raise the suppression of inflammatory cytokines, reduce promoting the inflammatory factor and suppressed of  $CD4^+/CD29^+$  expression

[**Key words**] ulcerative colitis; Lanyin Fengyang Huazhuo Jiedu prescription; IL-8; IL-10; T cell subsets

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)是一种原因不明的慢性非特异性炎症性肠病。随着现代生活方式的改变,其发病率在全球呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。随着生活方式、疾病谱及人们体质变化,我们临床发现浊毒相干为害贯穿 UC 发展的全过程,“浊毒内蕴”是本病的主病机<sup>[2]</sup>。以“浊毒”立论的兰茵凤扬化浊解毒方经多年临床应用及实验研究显示出良好的治疗 UC 作用<sup>[3-6]</sup>。本实验通过兰茵凤扬化浊解毒方对模型大鼠外周血 T 细胞亚群  $CD4^+/CD29^+$ , 血清白介素(IL)-8, IL-10 的影响,探讨其治疗溃疡性结肠炎的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 8 周龄健康 Wistar 大鼠,雄性,60 只,清洁级,体重 120 ~ 140 g,普通饲料适应性喂养 1 周后入选。实验动物购于华中科技大学同济医学院实验动物学部,合格证号 SCXR(鄂)2004-0007。

**1.2 药物** 兰茵凤扬化浊解毒方:藿香 12 g,佩兰 15 g,茵陈 15 g,泽泻 6 g,厚朴 6 g,苍术 12 g,凤尾草 15 g,飞扬草 15 g,胡黄连 12 g,地榆 15 g,石榴皮 12 g,儿茶 6 g,仙鹤草 15 g,乌梅 9 g,佛手 12 g,白芍药 15 g。所需药物均购自四川新绿色药业科技发展股份有限公司研发的免煎制剂。上述药物用蒸馏水溶解稀释配制成大剂量含药物  $10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,小剂量含药物  $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的中药混悬液备用。柳氮磺胺吡啶片(SPAP,上海三维制药有限公司生产,批号 200807C04),研细粉,过 100 目筛,用蒸馏水配成混悬液。

**1.3 试剂** 无水乙醇(分析纯,北京化工厂生产),2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国 Sigma 公司产品,批号 2508-19-2),IL-8 及 IL-10 ELISA 试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司提供)。

**1.4 仪器** ACS-EAS 电子天平(北京菲姆斯特科技开发公司),ELITE ESP 型流式细胞仪(Beckman-Coulter 公司),AO 切片仪(德国 Leica 公司),光学显微镜(日本 Olympus),RS-28 型高速低温离心机(德国贺利氏公司),AHB-2-LB 型万能照相机(日本 Olympus)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 大鼠随机分为 5 组,每组 12 只,分别为正常组、模型组、兰茵凤扬化浊解毒方高、低剂量组和 SPAP 对照组。

**2.2 模型制备** 参考文献[7-8],采用 TNBS/乙醇法诱导溃疡性结肠炎模型。操作方法:入选大鼠禁食不禁水 24 h 后称体质量,乙醚麻醉,用直径 2 mm 的一次性橡胶输液管缓慢推入距肛门约 8 cm 处的肠腔内,推入 TNBS ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和 0.25 mL 的 50% 乙醇溶液,每只大鼠约 0.5 mL;提起大鼠尾部,倒置 30 s 使造模剂充分深入大鼠肠腔,再捏紧大鼠肛门平放 10 min 左右。正常组予同体积的 0.9% NaCl 溶液。造模后大鼠归笼,常规饲养,自由饮食。造模期间模型组和对照组各死亡 1 只。

**2.3 给药途径和方法** 正常组正常喂养;模型组予蒸馏水  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ ;兰茵凤扬化浊解毒方高、低剂量组按  $20, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ ;SPAP 组按  $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ (相当于成人用药量的 10 倍)。各组每日给药 1 次,连续  $\text{ig}$  14 d。

**2.4 标本处理** 给药 14 d 后,将大鼠禁食不禁水 24 h;用 25% 的乌拉坦  $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ip}$  麻醉,开腹,右股动脉取血;每只取血 4 mL 做相应指标的检测;在距肛门 8 cm 处迅速剪取病变组织  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ ,结肠标本采集后立即固定于 10% 的福尔马林溶液中 24 h 以上;梯度乙醇脱水,石蜡包埋,常规切片(厚度  $3 \mu\text{m}$ ),HE 染色,显微镜下观察。

## 2.5 指标测定

**2.5.1 疾病活动指数(DAI)评分** 参照 Murano 等<sup>[9]</sup>制定的 DAI 评分标准,见表 1。

表 1 DAI 评分标准

积分	体质量下降/%	大便性状	潜血
0	-	正常	-
1	1 ~ 5	-	-
2	6 ~ 10	半成形	+
3	11 ~ 15	-	-
4	>15	稀便	肉眼血便

$$\text{DAI} = (\text{体质量下降分数} + \text{大便性状分数} + \text{便血分数}) / 3$$

2.5.2 结肠黏膜大体观与组织病理学观察

2.5.3 血清 IL-8, IL-10 含量测定 采用酶联免疫吸附测定法测定血清 IL-8, IL-10 的含量, 具体方法和操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

2.5.4 外周血 CD4<sup>+</sup> 及 CD29<sup>+</sup> 表达测定 采用流式细胞仪分析外周血 CD4<sup>+</sup> 及 CD29<sup>+</sup> 表达。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计处理软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析。P <

0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 DAI 评分比较 与模型组比较, 中药高、低剂量组、对照组分值均下降 (P < 0.05); 中药高、低剂量组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 中药高剂量组与 SPAP 组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 各组大鼠 DAI 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	体质量下降/%	大便性状/分	潜血/分	DAI/分
正常	12	-	0.00 ± 0.00 <sup>1)</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>1)</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>1)</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>1)</sup>
模型	11	-	3.15 ± 0.24	2.41 ± 0.34	2.13 ± 0.39	2.56 ± 0.23
兰茵凤扬化浊解毒方	12	20	0.89 ± 0.15 <sup>1,2,3)</sup>	0.69 ± 0.25 <sup>1,3)</sup>	0.47 ± 0.22 <sup>1,2,3)</sup>	0.68 ± 0.13 <sup>1,2,3)</sup>
	12	5	1.21 ± 0.16 <sup>1)</sup>	1.07 ± 0.20 <sup>1,4)</sup>	1.00 ± 0.24 <sup>1)</sup>	1.08 ± 0.11 <sup>1)</sup>
SPAP	11	0.3	1.19 ± 0.14 <sup>1)</sup>	1.07 ± 0.23 <sup>1)</sup>	1.01 ± 0.21 <sup>1)</sup>	1.09 ± 0.10 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05; 与 SPAP0.3 g·kg<sup>-1</sup> 组比较<sup>2)</sup>P < 0.05; 与兰茵凤扬化浊解毒方 5 g·kg<sup>-1</sup> 组比较<sup>3)</sup>P < 0.05 (表 3~4 同)。

3.2 各组大鼠结肠黏膜大体观与组织病理学情况比较 肉眼观察大鼠结肠黏膜模型组最差, 中药高剂量组恢复接近正常组, SPAP 组和中药低剂量组结肠黏膜状况介于中药高剂量组和模型组之间, 两组无明显区别。在组织病理学方面: 与正常组比较, 其余各组大鼠结肠黏膜上皮细胞完整度、腺体结构、杯状细胞等方面均有所改变, 可见不同程度的充血、水肿、糜烂及溃疡灶形成, 以模型组大鼠表现最为明显; 与模型组比较, 各治疗组大鼠结肠黏膜均有不同程度的恢复, 其中兰茵凤扬化浊解毒方高剂量组大鼠结肠黏膜接近正常组, 恢复程度较好; 模型组仍可见组织水肿和充血、炎性细胞浸润及溃疡存在, 恢复较差。SPAP 组和中药低剂量组结肠黏膜恢复介于中药大剂量组和模型组之间。

3.3 各组大鼠血清中 IL-8, IL-10 含量比较 与模型组比较, 兰茵凤扬化浊解毒方高、低剂量组、对照组 IL-8 含量均下降 (P < 0.05), 而 IL-10 含量均升高 (P < 0.05); 见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IL-8 和 IL-10 含量 ( $\bar{x} \pm s$ ) g·L<sup>-1</sup>

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-8	IL-10
正常	12	-	0.277 ± 0.037	0.805 ± 0.085
模型	11	-	0.483 ± 0.051	0.467 ± 0.050
兰茵凤扬化浊解毒方	12	20	0.293 ± 0.030 <sup>1,2,3)</sup>	0.710 ± 0.062 <sup>1,2,3)</sup>
	12	5	0.358 ± 0.073 <sup>1)</sup>	0.615 ± 0.057 <sup>1)</sup>
SPAP	11	0.3	0.347 ± 0.049 <sup>1)</sup>	0.585 ± 0.071 <sup>1)</sup>

3.4 各组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> T 细胞亚群数量的比较 与模型组比较, 兰茵凤扬化浊解毒方 2 个剂量组、对照组均降低, 差异均有统计学意义 (P < 0.05); 兰茵凤扬化浊解毒方高、低剂量组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 中药高剂量组与 SPAP 组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 4。

表 4 各组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> T 细胞亚群数量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	CD4 <sup>+</sup> /CD29 <sup>+</sup>
正常	-	12	5.07 ± 1.98 <sup>1)</sup>
模型	-	11	15.12 ± 3.98
兰茵凤扬化浊解毒方	20	12	4.89 ± 1.80 <sup>1,2,3)</sup>
	5	12	10.22 ± 2.35 <sup>1)</sup>
SPAP	0.3	11	9.80 ± 2.12 <sup>1)</sup>

4 讨论

溃疡性结肠炎是一种以慢性炎症和溃疡形成为主要病理特点的结肠黏膜层的消化道疾病, 是体内的环境因素改变引起的机体免疫系统对肠道正常菌群的免疫耐受的失衡<sup>[10]</sup>。肠道免疫反应的调节有赖于免疫细胞、免疫因子及免疫球蛋白的参与, 因此 UC 的发病涉及到 T 细胞亚群及炎症介质的变化<sup>[11]</sup>。T 细胞亚群是机体免疫防御系统的重要组成部分。CD4<sup>+</sup> T 细胞与 UC 病情程度正相关, 与病情好转负相关<sup>[12]</sup>。CD29<sup>+</sup> 是整联蛋白的 β1 链, 与整联蛋白 α-亚单位共价结合为异构体, 统称非常晚

期抗原,介导细胞免疫黏附,CD29 和 CD4 共同表达可认为是 CD4<sup>+</sup> 辅助性 T 细胞亚群的标志,CD4<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> T 细胞辅助 B 细胞产生抗体,其升高可造成机体发生免疫异常<sup>[13]</sup>。在正常情况,两者之间保持一定的比例,维持机体的细胞免疫功能,如果两者不能相互协调可导致机体免疫功能的缺陷。IL-8 是重要的促炎症细胞因子,主要由单核细胞、T 淋巴细胞、内皮细胞产生,是一种强有力的中性粒细胞趋化和活化因子,促进中性粒细胞的溶酶体酶活性及吞噬作用,另外对嗜碱粒细胞和 T 细胞也有一定的趋化作用。研究表明:UC 患者 IL-8 水平升高,其水平与患者疾病严重程度、累及范围及是否复发相关<sup>[14]</sup>。IL-10 是一种潜在的抑炎症细胞因子,具有免疫调节和抗炎的作用,血浆中 IL-10 浓度降低可使炎症反应加强,促使溃疡的形成<sup>[15]</sup>。在肠道免疫中起到关键作用。

本实验结果表明,中药大剂量组血清中 IL-8 含量、外周血中 CD4<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> T 细胞亚群数量均低于模型组和 SPAP 组 ( $P < 0.05$ ), 中药高剂量组血清中 IL-10 含量均高于模型组和 SPAP 组 ( $P < 0.05$ )。

中医学无溃疡性结肠炎病名,据其症状可归属于“久痢”“肠风”“泄泻”等范畴。笔者认为本病病位在大肠,与脾胃关系密切,浊毒相干为害贯穿于 UC 发展的全过程,“浊毒内蕴”是本病的主病机。浊毒致病具有易耗气伤血,易败坏脏腑,顽固性、难治性等“三易”、“四性”的特征<sup>[16]</sup>。该病的病理变化主要是:浊毒之邪壅滞肠间,与气血相搏,脂膜和血络受损,腐败化脓。兰茵凤扬化浊解毒方中佩兰“能解郁散结,杀蛊毒,除陈腐,濯垢腻,辟邪气”(《本草便读》),与藿香、茵陈配伍芳香化浊;凤尾草、飞扬草清热解毒,飞扬草具有消炎、止泻、止痛、镇静等作用<sup>[17]</sup>;苍术、厚朴、泽泻燥湿健脾;佛手、仙鹤草、地榆、白芍凉血解毒、理气止痛;胡黄连、石榴皮、儿茶、乌梅清热止血、涩肠止泻。诸药合用,共奏“化浊解毒理肠”之功,使浊毒去而诸症消。

本研究结果表明:兰茵凤扬化浊解毒方对 TNBS/乙醇法的实验性 UC 大鼠有良好的治疗作用,可能是通过下调促炎症因子,上调抑炎症因子,抑制 CD4<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> T 细胞亚群表达起到抗炎和调节免疫的作用。

## [参考文献]

[1] Kamikozuru K, Fukunaga K, Hirota S, et al. The expression profile of functional regulatory T cells, CD4<sup>+</sup>

CD25high + /fork-head box protein P3 +, in patient with ulcerative colitis during active and quiescent disease [J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(2):320.

- [2] 杜艳茹,张纨,王延峰,等. 李佃贵从浊毒论治溃疡性结肠炎[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(2):7.
- [3] 刘启泉,杜艳茹,杨卓杰,等. 兰茵凤扬化浊解毒方对溃疡性结肠炎患者血浆白介素-1 $\beta$  及血清中 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 中成药, 2011, 33(4):567.
- [4] 刘启泉,苏晓兰,杜艳茹,等. 兰茵凤扬化浊解毒方对溃疡性结肠炎患者血小板功能状态的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(8):1536.
- [5] 刘启泉,苏晓兰,曹琴英,等. 兰茵凤扬化浊解毒方对溃疡性结肠炎 C 反应蛋白活性的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5):35.
- [6] 刘启泉,苏晓兰,王艳玲,等. 兰茵凤扬化浊解毒方对溃疡性结肠炎大鼠 TNF- $\alpha$ 、TLR4 及 NF-kBp65 表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(12):76.
- [7] 郑礼,高振强,王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(4):370.
- [8] 王皓,欧阳钦,胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立[J]. 胃肠病学, 2001, 6(1):7.
- [9] Murano M, Mae mura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of in tracoionl cally administered nuclear factor kappa B (p65) ant is en se oli gonucl eoti deonmouse dextran sulphate sodium (DSS) induced colitis [J]. Clin Exp Immuno, 2000, 120(1):51.
- [10] 王坤,宣秀敏,王莲,等. 溃疡性结肠炎大鼠外周血 CD4<sup>+</sup> CD25 + Treg 的变化及相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(3):354.
- [11] 王爱磊,张晓明. 溃疡性结肠炎大鼠细胞因子及 T 细胞亚群变化的实验研究[J]. 四川中医, 2009, 30(5):636.
- [12] 郑学宝,封艳玲,刘洪波,等. 黄芩汤对湿热型溃疡性结肠炎大鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞及其共刺激分子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):169.
- [13] 杜艳茹,张纨,王延峰,等. 李佃贵从浊度论治溃疡性结肠炎[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(2):7.
- [14] 陈爱民,刘永芬,熊雯雯,等. 芪仙汤对溃疡性结肠炎患者 TNF- $\alpha$ , IL-8 的影响及疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):255.
- [15] 陈玉杰. 蒲公英水提物对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):205.
- [16] 刘启泉,李佃贵,张纨,等. 慢性胃炎从浊毒论治[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(3):153.
- [17] 章佩芬,罗焕敏. 飞扬草药理作用研究[J]. 中药材, 2005, 28(5):437.

[责任编辑 聂淑琴]