

## 侗药五味止泻汤对溃疡性结肠炎 大鼠血清 IL-1, IL-10 的影响

赖象权<sup>1\*</sup>, 何本求<sup>2</sup>, 周宏燕<sup>1</sup>, 肖成<sup>1</sup>, 王子明<sup>1</sup>, 朱东东<sup>1</sup>

(1. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的:研究侗药五味止泻汤对溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠损伤的修复作用及对血清 IL-1 和 IL-10 的影响。方法:以 2,4,6-三硝基苯磺酸和乙醇灌肠法制备 UC 大鼠模型,将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,侗药五味止泻汤低、中、高剂量组(5.5, 11, 22 g·kg<sup>-1</sup>)和美沙拉嗪(0.5 g·kg<sup>-1</sup>)组,共 6 组,每组 10 只。低、中、高剂量组分别给予不同剂量侗药五味止泻汤 ig,美沙拉嗪组予以美沙拉嗪 ig,正常组及模型组灌服等体积蒸馏水。10 d 后观察大鼠一般情况及组织病理学改变,透射电镜观察结肠超微结构改变,采用 ELISA 法检测各组大鼠的血清白介素-1(IL-1)、白介素-10(IL-10)的水平。结果:与模型组比较,侗药五味止泻汤 3 个剂量组均能有效提高大鼠血清 IL-10 含量,降低 IL-1 含量( $P < 0.01$ ),并对损伤的结肠黏膜有明显的修复作用,降低结肠黏膜损伤指数( $P < 0.01$ )。结论:侗药五味止泻汤通过抑制促炎细胞因子 IL-1,促进抗炎细胞因子 IL-10 生成,发挥对 UC 的治疗作用。

**[关键词]** 侗药五味止泻汤; 溃疡性结肠炎; 病理学改变; 白介素-1; 白介素-10

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0227-04

## Effect of Dongyao Wuwei Zhixie Decoction on Serum Levels of IL-1 and IL-10 in Rats with Ulcerative Colitis

LAI Xiang-quan<sup>1\*</sup>, HE Ben-qiu<sup>1</sup>, ZHOU Hong-yan<sup>1</sup>, XIAO Cheng<sup>1</sup>, WANG Zi-ming<sup>1</sup>, ZHU Dong-dong<sup>1</sup>

(1. First Hospital Affiliated to Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Guiyang 550001, China; 2. Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Dongyao Wuwei Zhixie decoction on serum levels of interleukin-1 (IL-1) and interleukin-10 (IL-10) in rats with intestinal ulcerative colitis and. **Method:** Ulcerative colitis rat model was copied by 2, 4, 6-TNBS. Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group, Dongyao Wuwei Zhixie decoction low, middle and high dose group (5.5, 11, 22 g·kg<sup>-1</sup>), Mesalazine group (0.5 g·kg<sup>-1</sup>), 10 in each group. The general situation and histopathological changes were observed. The ultrastructural changes of UC model rats were investigated by transmission electron microscope and the rat serum levels of IL-1, IL-10 were detected by ELISA 10 days later. **Result:** Dongyao Wuwei Zhixie decoction effectively improved the serum levels of IL-10, reduced the serum levels of IL-1, and had significant effect of repairing the intestinal mucosal injury. **Conclusion:** Dongyao Wuwei Zhixie decoction achieves a therapeutic effect by inhibiting the production of proinflammatory cytokines IL-1 and improving the production of antiinflammatory cytokines IL-10.

**[Key words]** Dongyao Wuwei Zhixie decoction; ulcerative colitis; histopathological changes; interleukin-1; interleukin-10

**[收稿日期]** 20120326(001)

**[基金项目]** 贵州省贵阳市科技局项目(筑科合同[2011103]号);贵阳中医学院研究生教育创新计划项目(ZYYCX11003)

**[通讯作者]** \* 赖象权,副教授,从事中医药对肛肠疾病的研究与治疗及少数民族医药治疗肛肠疾病的研究, Tel:13984193998, E-mail: gyxc163@163.com

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 又称非特异性溃疡性结肠炎, 与克隆氏病 (Crohn's disease, CD) 合称为炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)。UC 是一种原因不明的慢性直肠和结肠炎性疾病, 近年来炎症性肠病 (IBD) 尤其是溃疡性结肠炎 (UC) 的发病率呈逐年上升趋势, 其确切病因和发病机制迄今未明, 多数学者认为, 可能是遗传、环境和免疫等多因素共同作用的结果。目前认为促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡失调所致的免疫异常是 UC 的重要发病机制<sup>[1]</sup>。目前对 UC 尚无满意的治疗手段, 祖国医药对 UC 的治疗具有不可忽视的作用。侗药五味止泻汤采集自贵州黔东南少数民族地区的侗族验方, 长期流传于少数民族地区具有确切的治疗效果。本实验我们采用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 致敏和乙醇诱导的复合灌肠法制作大鼠实验性溃疡性结肠炎模型, 通过观察药物对 UC 大鼠模型结肠组织学、超微结构改变及血清白介素-1 (IL-1)、白介素-10 (IL-10) 水平的影响, 来探讨侗药五味止泻汤治疗 UC 的作用机制, 进一步验证该药疗效, 从而为高质量的抗 UC 少数民族医药开发和进一步的临床应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠 60 只, SPF 级, 雌雄各半, 体重 180~220 g, 由第三军医大学大坪医院医学实验中心提供, 动物合格证号 SCXK(渝)2007-0005。

**1.2 药品、试剂** 侗药五味止泻汤药物组成: 登虬辰 20 g, 尚圣箴 15 g, 奴域 15 g, 美皂阁 10 g, 靠堆 10 g。侗药五味止泻汤所用药材购于贵阳中医学院第一附属医院药剂科; 美沙拉嗪肠溶片 (佳木斯鹿灵制药有限公司, 批号 110803), 5% 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 水溶液 (Sigma 公司, 批号 P2297), 无水乙醇 [重庆川东化工 (集团) 有限公司, 批号 20110701], ELISA IL-1 试剂盒 (R&D 公司, 批号 DER20113), ELISA IL-10 试剂盒 (R&D 公司, 批号 DRE20095)。

**1.3 仪器** Olympus Vanox 显微镜; 600 型透射电镜 (日立)。

## 2 方法

**2.1 分组** 大鼠适应性喂养 7 d 后, 采用随机数字表法随机分为正常组, 模型组, 侗药五味止泻汤低、中、高剂量组和美沙拉嗪组, 每组 10 只。

**2.2 造模** 采用 TNBS/乙醇复合灌肠法制作溃疡性结肠炎大鼠模型。将大鼠正常饲养 1 周后, 禁食 24 h (不禁水), 称重, 10% 水合氯醛 (3.8 mL·kg<sup>-1</sup>)

腹腔麻醉, 将一直径 2 mm、长约 12 cm 的橡胶管由大鼠肛门轻柔插入, 深约 8~10 cm, 然后推入 TNBS 溶液 (含 2.5% TNBS 和 50% 乙醇) 2 mL·kg<sup>-1</sup>, 约 5 s 灌注完毕; 将造模鼠倒置 2 min 后 (尽量减少造模剂流出) 放回笼内。造模后第 3 天, 侗药五味止泻汤低、中、高剂量组 (5.5, 11, 22 g·kg<sup>-1</sup>)、阳性药美沙拉嗪 (0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 组分别同时开始按上述剂量 ig 给药, 给药体积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>。正常组及模型组 ig 给等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 10 d。期间观察大鼠精神活动、饮食状况、粪便性质、体重的改变。

**2.3 标本的获取** 连续 ig 10 d, 末次给药 24 h 后, 10% 水合氯醛 (3.8 mL·kg<sup>-1</sup>) ip 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 取血清, -20 °C 保存, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA) 进行检测, 严格按试剂盒说明书进行操作检测血清 IL-1, IL-10 水平。取距肛门大约 8 cm 结肠, 沿纵轴剪开, 用自来水清洗干净, 再用结肠清洗液清洗 2 遍, 肉眼观察结肠大体形态并进行结肠黏膜损伤指数 (CMDI) 评分, 参考评分标准<sup>[2]</sup>: 无损伤为 0 分; 轻度充血, 水肿, 表面光滑, 无糜烂或溃疡为 1 分; 充血水肿, 黏膜粗糙呈颗粒状, 有糜烂或肠黏膜连为 2 分; 高度充血水肿, 黏膜表面有坏死及溃疡形成, 溃疡最大纵径 < 1.0 cm, 肠壁增厚或表面有坏死及炎症为 3 分; 在 3 分基础上溃疡最大纵径 > 1.0 cm, 或全肠壁坏死为 4 分。剪取结肠病变最严重的部位, 放入 10% 中性福尔马林缓冲溶液中固定。大体观察后, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 显微镜下观察各组标本病理改变以及超薄切片进行透射电镜观察结肠上皮细胞超微结构。

**2.4 统计学处理** 应用 SPSS 15.0 统计软件, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 一般状况** 模型组: 在造模后的第 2 天即出现出现腹泻, 解黄色稀便、半稀便甚至血便, 毛色失去光泽, 活动及进食明显减少, 喜贴边及扎堆, 反应迟缓、懒动, 体重下降, 到实验结束时, 仍排稀烂便, 死亡 1 只。侗药五味止泻汤中、高剂量组大鼠和美沙拉嗪组在用药后 1 周精神渐恢复正常, 毛色渐有光泽, 食欲增强, 活动逐渐增多, 大便逐渐转为成形大便。侗药五味止泻汤低剂量大鼠在用药后精神也渐恢复, 毛色渐有光泽, 大便也逐渐成形, 但效果不如中、高剂量组明显, 进程相对缓慢, 实验结束时死亡 1 只。正常组大鼠则无上述精神、食欲、活动、毛

色异常以及大便变化。

**3.2 各组大鼠 CMDI 评分比较** 模型组大鼠 CMDI 评分明显增加,与正常组比较具有显著性差异( $P < 0.05$ );与模型组比较,侗药五味止泻汤低、中、高剂量组、美沙拉嗪组均降低,有显著性差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 侗药五味止泻汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠 CMDI 评分的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	CMDI 评分/ <i>分</i>
正常	-	10	0.10 ± 0.32
模型	-	9	3.22 ± 0.83 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪	0.5	10	0.90 ± 0.74 <sup>2)</sup>
侗药五味止泻汤	5.5	9	2.56 ± 0.53 <sup>2,3)</sup>
	11	10	1.90 ± 0.74 <sup>2,3)</sup>
	22	10	0.90 ± 0.88 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与美沙拉嗪组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 2 同)。

**3.3 结肠组织病理切片(HE 染色)观察** 正常组:大体见结肠各层结构清晰,无水肿、充血,上皮细胞排列整齐,表面光滑,无炎细胞浸润及溃疡形成,见图 1A。模型组:可见黏膜层不同程度的上皮组织坏死,黏膜多处糜烂、坏死、出血,有多发大小不等溃疡形成,腺体结构紊乱,杯状细胞减少,黏膜下固有层局部充血、水肿,黏膜及黏膜下大量炎细胞浸润,见图 1B。侗药五味止泻汤小剂量组:大鼠结肠黏膜可见上皮表层仍有大部分脱落,仍见炎症中度充血、水肿,镜下较模型组略有好转,黏膜下层中等量炎性细胞浸润。见图 1C。中剂量侗药五味止泻汤:可见上皮组织脱落缺损减轻,溃疡附近肠黏膜可见不连续覆盖,镜下见肠黏膜组织腺体形态结构明显好转,淋巴组织丰富,炎细胞浸润减少,见图 1D。高剂量侗药五味止泻汤:大体见结肠黏膜较光滑,上皮结构基本完整,组织缺损不明显,肉芽组织增生显著;镜下见肠黏膜表层上皮及腺上皮基本正常,腺体排列较规则,黏膜下无明显充血,间质少量炎细胞浸润,见图 1E。西药对照组结肠黏膜充血、水肿、糜烂得到明显改善,黏膜层内可见少量炎细胞浸润,黏膜下层血管扩张充血。见图 1F。

**3.4 结肠黏膜上皮超微结构变化** 电镜下,正常组大鼠结肠黏膜上皮表面的微绒毛完整,内质网未见扩张,线粒体无肿胀。模型组结肠黏膜上皮细胞绒毛脱落,细胞间隙增宽,线粒体肿胀,嵴模糊,内质网扩张。侗药五味止泻汤低剂量组细胞超微结构与模

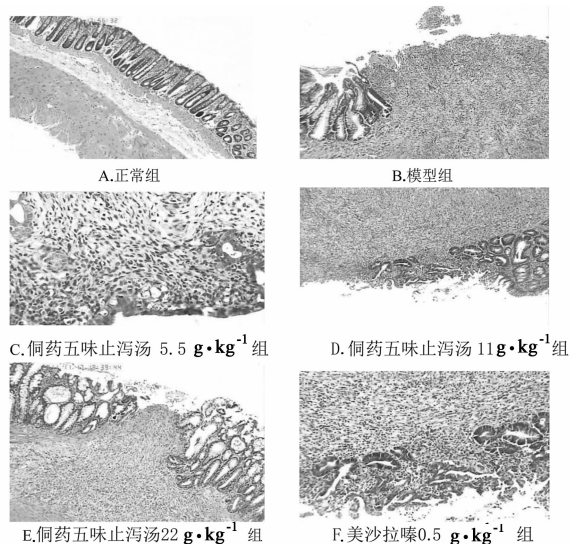


图 1 侗药五味止泻汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病变的影响(HE,  $\times 100$ )

型组相比,细胞间隙增宽程度减轻。侗药五味止泻汤中剂量组、高剂量组和美沙拉嗪组大鼠结肠黏膜上皮细胞有较多的粗短的微绒毛,排列整齐,腺上皮间相互连接紧密,未见扩张的内质网及肿胀的线粒体。

**3.5 各组大鼠血清 IL-1, IL-10 水平比较** 与正常组比较,模型组大鼠 IL-1 水平显著升高( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,侗药五味止泻汤低、中、高剂量组、美沙拉嗪组大鼠 IL-1 显著降低( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著上升( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 侗药五味止泻汤对大鼠血清 IL-1, IL-10 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	IL-1	IL-10
正常	-	10	47.39 ± 3.03	52.89 ± 0.84
模型	-	9	129.39 ± 2.66 <sup>1)</sup>	16.55 ± 0.97 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪	0.5	10	81.12 ± 3.88 <sup>2)</sup>	47.98 ± 2.28 <sup>2)</sup>
侗药五味止泻汤	5.5	9	113.19 ± 2.41 <sup>2,3)</sup>	25.97 ± 0.99 <sup>2,3)</sup>
	11	10	103.67 ± 2.53 <sup>2,3)</sup>	36.19 ± 0.76 <sup>2,3)</sup>
	22	10	80.07 ± 3.30 <sup>2)</sup>	47.03 ± 1.02 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

UC 是一种病因尚不十分清楚的慢性非特异性结肠炎症性疾病。现已证明,此病是多因素作用的结果,其中细胞因子在 UC 的发生发展中起着不可忽视的作用,认为细胞因子失衡是 UC 产生肠道非特异性炎症反应的关键环节。研究发现,细胞因子的异常表达在 UC 的好生、发展和转归中发挥重要

作用<sup>[3]</sup>。细胞因子分促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子,正常人群中这两类细胞因子处于平衡状态。促炎症反应细胞因子如 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN, TNF 等, 抗炎细胞因子如 IL-4, IL-10, IL-13 等均与溃疡性结肠炎的发病及病程进展有关<sup>[4]</sup>。

UC 的发病不仅涉及系统免疫功能紊乱, 还存在着肠道黏膜局部免疫功能的异常, 而细胞因子参与免疫反应和炎症过程, 尤其是 IL-1 被公认为是单核巨噬细胞产生的并能介导 UC 发病的细胞因子之一。IL-1 主要由巨噬细胞释放, 并反作用于巨噬细胞和 T 淋巴细胞促进 IL-2, IL-4, IL-8 和 INF- $\gamma$  等的释放导致炎症, 最终造成 UC 的发病。IL-10 又名细胞因子合成抑制因子, 目前多认为 IL-10 是一种重要的负向调节细胞因子, 对免疫炎症反应发展过程中的多个环节均有阻断作用, 具有广泛的免疫抑制活性<sup>[5-6]</sup>。已知, IL-10 缺失能导致自发性的由 Th1 T 细胞介导的类似于 CD 的结肠炎<sup>[7]</sup>。动物实验发现, IL-10 基因缺陷小鼠在无特异性致病菌的普通动物饲养条件下能自发慢性非感染性肠道炎症<sup>[8]</sup>, 说明 IL-10 在维持正常肠道黏膜免疫系统调节中发挥重要的作用。

UC 在中医古籍中无该病名记载, 在中医中属“痢疾”、“泄泻”、“便血”、“肠风”、“滞下”等疾病范畴, 其基本病机变化为脾胃受损, 湿困脾土致肠道功能失司, 病位在肠。《古今医鉴》曰“夫泄泻者, 脾胃为饮食生冷之所伤, 或为暑湿风寒之所感, 脾胃停滞, 而为泄泻也”。在治疗 UC 方面, 中医药具有价廉且不良反应小, 远期效果好等优势, 侗药五味止泻汤采集自贵州黔东南少数民族地区的侗族验方, 方中重用登虐辰性平味酸、涩, 属肺胃大肠经, 具有收敛止泻功效; 靠堆性凉味苦, 归经肺、脾、肝经, 健脾利湿, 解毒止泻, 能助登虐辰增强收敛止泻功效; 奴域性寒味苦, 具有清热解毒功效, 现代药理表明具有较强抗菌作用; 尚圣箴清热利湿, 化瘀止血; 美皂阁辛温, 属肝、肺经, 能拔毒祛风, 在全方中能引诸药至溃处, 诸药合用, 共奏清热利湿、活血止泻之功效。本实验发现, 侗药五味止泻汤各剂量组在治疗后大鼠一般状况明显好转, 结肠组织充血、水肿明显减轻, 上皮组织缺损程度逐渐减轻, 炎性细胞浸润减

少, 结肠黏膜上皮超微结构得到明显改善, 说明侗药五味止泻汤对 UC 大鼠结肠损伤具有明显的修复作用。实验中侗药五味止泻汤能降低大鼠血清 IL-1 水平, 并且提高大鼠血清 IL-10 含量, 说明侗药五味止泻汤可能是通过增加 IL-10 的表达, 减少 IL-1 的产生而抑制 UC 大鼠的炎症反应, 调节了促炎症性细胞因子和抗炎症性细胞因子之间的失衡, 这可能是侗药五味止泻汤治疗 UC 的作用机制之一, 从而为高质量的抗 UC 少数民族医药的开发和进一步的临床应用提供理论依据。

### [参考文献]

- [1] Anand A C, Adya C M. Cytokines and inflammatory bowel disease [J]. Trop Gastroenterol, 1999, 20 (3): 97.
- [2] Myers K J, Murthy S, Flanigan A, et al. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor-alpha in two murine models of colitis [J]. Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(1): 411.
- [3] 桑力轩, 刘汉立, 姜敏. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(2): 2249.
- [4] Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemona H. Thecytokines in inflammatory bowel disease [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2009, 63(1): 389.
- [5] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10 producing regulatory B cell subset characterized by CD1 dupregulation [J]. Immunity, 2002, 16(2): 219.
- [6] Wiehan P, Chojnacki J, Wojtufi S. Immunotherapy of inflammatory bowel disease [J]. Pol Merkur Lekarski, 2004, 17 (1): 40.
- [7] Lindsay J O, Ciesielski C J, Scheinin T, et al. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis [J]. Gut, 2003, 52(3): 981.
- [8] Song J, Matsuda C, Kai Y, et al. A novel sphingosine 1-phosphate receptor agonist, KRP-203, regulates chronic colitis in interleukin-10 gene-2 deficient mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324 (1): 276.

[责任编辑 聂淑琴]