

四逆散及不同配伍干预溃疡性结肠炎的研究

卢健^{1,2}, 范颖¹, 马骥^{1*}, 王丽娜¹, 林蔗茹¹, 徐丹¹

(1. 辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110032; 2. 辽宁卫生职业技术学院, 沈阳 110101)

[摘要] 目的: 研究四逆散及其不同配伍干预实验性溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的效用。方法: 将动物分为 14 组, 采用免疫法造模, 以大鼠一般状况、结肠组织大体情况、结肠组织病理变化, 胸腺指数、脾脏指数和结肠组织核因子- B (nuclear factor Kappa B , $\text{NF-}\mathbf{B}$) 活性作为观察与检测指标。结果: 模型组各项指标均与正常组存在显著差异 ($P < 0.01$); 模型组结肠损伤程度评分为 4.00 ± 0.67 , 与模型组比较, 各药组的结肠损伤程度均显著降低 ($P < 0.01$); 模型组结肠病理组织学评分 (4.40 ± 1.07) 明显高于正常组 (0.40 ± 0.52), $P < 0.01$, 余各药组结肠病理组织变化呈好转趋势, 其中, 四逆散组 (2.80 ± 0.79) 和柴芍枳组 (3.20 ± 0.79)、柴芍甘组 (3.40 ± 0.70)、柴芍组 (3.20 ± 0.79)、柴枳组效果明显 (3.33 ± 0.71), $P < 0.05$; 四逆散及其不同配伍能够提高模型大鼠的胸腺指数 ($P < 0.05$) 与脾脏指数 ($P < 0.01$); 模型组结肠组织 $\text{NF-}\mathbf{B}$ 平均吸光度为 0.088 ± 0.009 , 各组 $\text{NF-}\mathbf{B}$ 活性均呈现下降趋势, 以四逆散全方组 (0.023 ± 0.006) 效果最为明显 ($P < 0.01$)。结论: 四逆散能够干预实验性 UC, 其作用可能是通过刺激免疫器官分泌免疫细胞, 抑制 $\text{NF-}\mathbf{B}$ 的激活来实现的; 四逆散全方作用最为理想, 柴胡、芍药发挥了君药与臣药的重要配伍作用, 甘草作为使药, 其协调作用主要体现在对胸腺细胞增殖的刺激。

[关键词] 四逆散; 配伍; 溃疡性结肠炎; 核因子- B

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0109-04

Study on Sini Powders and Different Compatibilities in Intervening Experimental Ulcerative Colitis

LU Jian^{1,2}, FAN Ying¹, MA Ji^{1*}, WANG Li-na¹, LIN Shu-ru¹, XU Dan¹

(1. Prescription Division, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Liaoning College of Health Vocational Technology, Shenyang 110101, China)

[Abstract] **Objective:** To study the Sini Powders and the different compatibilities in intervening experimental ulcerative colitis. **Method:** The experimental rats were divided into 14 groups and modeled with immunization. The status, colon organization and its pathological changes, thymus index, spleen index, activity of nuclear factor- Kappa B ($\text{NF-}\mathbf{B}$) of rats were observed. **Result:** All parameters of model group showed significant difference with that of the normal group ($P < 0.01$). Compared with model group (4.40 ± 1.07), the degrees of colonic injury of all drug groups were significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the model, pathological changes in colon for Sini powders group (2.80 ± 0.79), Chaishaozhi group (3.20 ± 0.79), Chaishaogan group (3.40 ± 0.70), Chaishao group (3.20 ± 0.79) and Chaizhi group (3.33 ± 0.71) were all evident. The Sini Powders and the different compatibilities could improve thymus index and spleen index. And activities of $\text{NF-}\mathbf{B}$ of all drug groups were decreased significantly, especially for the Sini Powders (0.023 ± 0.006) ($P < 0.01$). **Conclusion:** We speculate that the Sini Powders can intervene with the experimental UC by stimulating the immune organs to excrete the immune cells and inhibiting $\text{NF-}\mathbf{B}$ to be activated. Bupleurum and peony, as the monarch drug and the

[收稿日期] 20100512(001)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2006T093)

[第一作者] 卢健, 讲师, 方剂学博士在读, 研究方向: 方剂效用机制, Tel: 15242007553, E-mail: juioo@sina.com

[通讯作者] * 马骥, 教授, 方剂学博士生导师, 研究方向: 方剂效用机制, Tel: 024-31207028

ministerial drug in the prescription, play the important roles. Licorice plays a coordinating role through stimulating thymus cells proliferation as the conducting drug.

[Key words] Sini Powders; compatibility; ulcerative colitis; experiments; nuclear factor-Kappa B

四逆散源于《伤寒论·辨少阴病脉证并治》，方由柴胡、芍药、枳实、炙甘草组成，用于热厥手足不温，脘腹胁痛，泄痢下重。溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 以持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便为主要症状，伴腹痛、里急后重和不同程度的全身症状，属于中医“泄泻”，“痢疾”，“滞下”等范畴，亦属于“泄痢下重”证之一。理论上可以应用四逆散治疗。

本研究以 UC 为对象病证，通过实验方法，拆方分析四逆散不同配伍干预实验性 UC 的效用，为古典经方配伍研究提供思路和方法。

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；固肠止泻丸购自沈阳市东北大药房，批号 092440，由西安阿房宫药业有限公司提供。上述药物按临床成人用量的 6.3 倍折算实验大鼠的用量，分别为四逆散组 $1.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，柴芍枳组、柴芍甘组、柴枳甘组、芍枳甘组均为 $1.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，柴芍组、柴枳组、柴甘组、芍枳组、芍甘组、枳甘组均为 $0.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ；固肠止泻丸 $1.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2 动物 SD 大鼠 (SPF 级, 00800161042) 140 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。

1.3 试剂 NF- Bp65 单克隆抗体 (BA0610)、DAB 显色试剂盒 (AR1022)、多聚赖氨酸 (H10351) 均购自武汉博士德生物工程有限公司；PV-9000 通用型二步法检测试剂盒 (PV-9000)、EDTA 抗原乳化液 (CW0129)、PBS 缓冲液 (AR0030) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器与设备 ASP300 脱水机，德国徕卡仪器有限公司；SAKURA 包埋机，日本樱花会社；Leica (H11210) 烤片机，德国徕卡仪器有限公司；DH-GZX 电热恒温干燥箱，中国厦门医疗电子仪器厂；湿盒 (ZLI-9322)，北京中杉金桥生物技术有限公司；OLYMPUS 显微镜 (BX-51)，TKO 光学仪器株式会社

(日本)。

2 方法

2.1 分组 将实验大鼠按体重随机分为 14 组，分别为：正常组、模型组、对照组、四逆散组、柴芍枳组、柴芍甘组、柴枳甘组、芍枳甘组、柴芍组、柴枳组、柴甘组、芍枳组、芍甘组、枳甘组。每组 10 只，各组体重统计学比较无显著差异。

2.2 造模方法 采用免疫法造模。刮取新鲜家兔结肠黏膜制成组织匀浆，测定蛋白含量为 $24.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，使用时与等量完全弗氏佐剂充分混匀，制成抗原乳化液^[1]。除正常组外，其余各组于造模第 1 d 皮内注射抗原乳化液，分别注射于大鼠的双侧足跖、腹股沟及背部，每只需 0.5 mL；第 10, 17, 24 d 依同法注射。正常组依上法注射等量生理盐水、按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的质量浓度分别配制药物，于造模第 2 天开始分组 ig。每 24 h 观察 1 次大鼠皮毛、活动度、精神状态、饮食及饮水情况；每周测量 1 次体重。于第 29 天 ig 后 2 h，称重，麻醉后于腹主动脉取血，待测指标；然后全部处死，剖取结肠，自肛门 2 cm 上约 8 cm 处，剖开、展平，肉眼观察黏膜，作出结肠组织损伤积分比较；刮取部分结肠黏膜，待测指标；剩余部分结肠组织以多聚甲醛固定，做病理切片，镜下观察；摘取脾脏与胸腺，称质量，计算脾脏指数与胸腺指数 (脏器湿重 $\text{mg} \cdot (10 \text{g})^{-1}$ 体重)。

2.3 结肠组织病理切片 常规 HE 染色，光镜下观察。

2.4 结肠组织 NF- Bp65 活性的测定 采用免疫组化法 (SP)，按常规步骤进行。参考文献 [2]，确定结果判定标准。NF- Bp65 以胞浆着色为主，可伴少量胞核着色，阳性显色为棕黄色或深棕黄色颗粒。应用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件对结果进行分析，以平均吸光度反应 NF- Bp65 活性。

2.5 统计分析 采用统计软件 SPSS 10.0 处理，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 对实验性 UC 大鼠一般状况的影响 造模第 14 天，造模大鼠出现食量减少、拱背、聚堆、懒动。

造模第 21 天, 模型组大鼠均出现饮食明显减少, 稀便、毛发不泽, 拱背、聚堆、懒动, 各药物组大鼠上述症状有不同程度改善。

3.2 对实验性 UC 大鼠结肠组织损伤的影响

3.2.1 结肠黏膜损伤大体情况 模型组大鼠病变结肠肠壁增厚, 肠黏膜糜烂, 黏膜表面弥漫性充血、水肿, 可见出血点。各药物组大鼠结肠黏膜表现不同程度充血、水肿, 可见轻度糜烂和溃疡形成。按结肠组织形态学评分标准^[3] 分析各组大鼠结肠黏膜损伤情况, 详见表 1。

3.2.2 结肠组织病理学及其评分 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(图 1)。其余各组均有不同程度的病变。参考结肠病理组织学评分标准^[4], 分析实验大鼠的结肠组织损伤情况, 详见表 1。

3.3 对脾脏指数、胸腺指数以及结肠组织 NF- B 活性的影响, 见表 1。

表 1 四逆散不同配伍对各组实验大鼠观测指标的影响

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | n | 结肠组织损伤 程度评分 | 结肠病理 组织学评分 | 胸腺指数 /mg·(10g) ⁻¹ | 脾脏指数 /mg·(10g) ⁻¹ | 结肠组织 NF- B (A) |
|-------|---------------------------|----|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 正常 | - | 10 | 0.20 ±0.42 | 0.40 ±0.52 | 0.21 ±0.029 | 0.25 ±0.02 | 0.014 ±0.004 |
| 模型 | - | 10 | 4.00 ±0.67 ²⁾ | 4.40 ±1.07 ²⁾ | 0.18 ±0.022 ¹⁾ | 0.51 ±0.13 ²⁾ | 0.088 ±0.009 ²⁾ |
| 固肠止泻丸 | 1.40 | 10 | 2.70 ±0.67 ^{2,4)} | 3.10 ±0.74 ^{2,4)} | 0.21 ±0.043 ³⁾ | 0.69 ±0.20 ^{2,4)} | 0.041 ±0.010 ^{2,4)} |
| 四逆散 | 1.75 | 10 | 2.90 ±0.88 ^{2,4)} | 2.80 ±0.79 ^{2,4)} | 0.22 ±0.038 ³⁾ | 0.76 ±0.19 ^{2,4)} | 0.023 ±0.006 ⁴⁾ |
| 柴芍枳 | 1.31 | 10 | 2.70 ±0.67 ^{2,4)} | 3.20 ±0.79 ^{2,4)} | 0.19 ±0.032 | 0.58 ±0.19 ^{2,8)} | 0.043 ±0.007 ^{2,4,7)} |
| 柴芍甘 | 1.31 | 10 | 3.00 ±0.67 ^{2,4)} | 3.40 ±0.70 ^{2,4)} | 0.22 ±0.027 ³⁾ | 0.63 ±0.12 ^{2,7)} | 0.053 ±0.018 ^{2,4,8)} |
| 柴枳甘 | 1.31 | 10 | 2.90 ±0.74 ^{2,4)} | 3.50 ±0.85 ^{2,3,7)} | 0.21 ±0.037 ³⁾ | 0.66 ±0.13 ^{2,3)} | 0.060 ±0.009 ^{2,4,5,8)} |
| 芍枳甘 | 1.31 | 10 | 2.80 ±0.79 ^{2,4)} | 3.60 ±0.84 ^{2,3,7)} | 0.22 ±0.041 ³⁾ | 0.56 ±0.13 ^{2,5,8)} | 0.069 ±0.013 ^{2,3,6,8)} |
| 柴芍 | 0.88 | 10 | 2.70 ±0.67 ^{2,4)} | 3.20 ±0.79 ^{2,4)} | 0.13 ±0.047 ^{2,4)} | 0.56 ±0.11 ^{2,5,8)} | 0.043 ±0.007 ^{2,4,7)} |
| 柴枳 | 0.88 | 9 | 2.78 ±0.67 ^{2,4)} | 3.33 ±0.71 ^{2,4)} | 0.19 ±0.044 | 0.51 ±0.14 ^{2,6,8)} | 0.062 ±0.025 ^{2,4,5,8)} |
| 柴甘 | 0.88 | 9 | 3.00 ±0.71 ^{2,4)} | 3.56 ±0.73 ^{2,3,7)} | 0.22 ±0.037 ³⁾ | 0.53 ±0.14 ^{2,5,8)} | 0.084 ±0.029 ^{6,8)} |
| 芍枳 | 0.88 | 10 | 2.80 ±0.79 ^{2,4)} | 3.50 ±0.97 ^{2,3,7)} | 0.19 ±0.027 | 0.50 ±0.10 ^{2,6,8)} | 0.063 ±0.011 ^{2,4,5,8)} |
| 芍甘 | 0.88 | 10 | 2.90 ±0.74 ^{2,4)} | 3.70 ±0.82 ^{2,7)} | 0.21 ±0.042 ³⁾ | 0.57 ±0.12 ^{2,8)} | 0.046 ±0.012 ^{2,4,7)} |
| 枳甘 | 0.88 | 10 | 3.00 ±0.67 ^{2,4)} | 3.80 ±0.79 ^{2,5,8)} | 0.22 ±0.027 ³⁾ | 0.56 ±0.16 ^{2,5,8)} | 0.072 ±0.029 ^{6,8)} |

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⁾ $P < 0.01$; 与固肠止泻丸组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$; 与四逆散组比较⁷⁾ $P < 0.05$, ⁸⁾ $P < 0.01$ 。

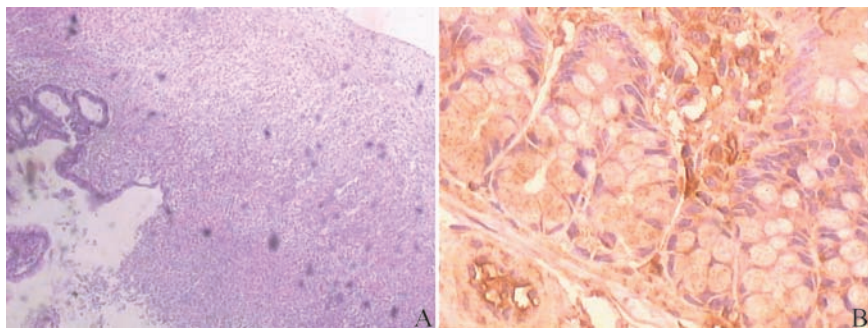


图 1 以家兔结肠黏膜组织匀浆与弗氏佐剂免疫制备大鼠溃疡性结肠炎模型结肠组织(HE 染色)
A. 模型组, 放大 100 倍; B. 模型组, 放大 400 倍

4 讨论

实验结果表明: 造模组大鼠的结肠损伤程度明显高于正常组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各药组大鼠的结肠损伤程度显著降低, 各药组间无明显差异。造模组大鼠的结肠病理组织学评分结果明显高

于正常组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 四逆散组和柴芍枳组、柴芍甘组、柴枳甘组、枳芍甘组、柴芍组、柴枳组、柴甘组、芍枳组的结肠病理组织学评分结果明显降低, 而芍甘组和枳甘组呈现降低趋势, 但与模型组比较无明显差异; 与四逆散组比较, 柴枳甘组、芍枳甘组、柴甘组、芍枳组、芍甘组和枳甘组明显增高。说明四逆散及不同配伍能不同程度地减轻结肠组织的损伤, 并能够促进实验性 UC 大鼠结肠病变组织修复, 在促进结肠组织修复方面, 含有柴、芍的药组作用更为明显, 体现了君药、臣药在组方中的重要地位。

胸腺指数的变化可一定程度反映胸腺细胞增殖及免疫功能的受损和恢复情况。实验结果表明, 模

型组大鼠的胸腺指数与正常组相比明显降低,灌服四逆散后,胸腺指数显著提高,与正常组无明显差异,说明四逆散具有刺激受损胸腺的细胞增殖,促进和调节免疫机能的作用。拆方研究表明,与模型组相比,四逆散组和柴芍甘组、柴枳甘组、芍枳甘组、柴甘组、芍甘组、枳甘组的胸腺指数显著升高,说明在刺激受损免疫中枢器官胸腺的细胞增殖、增强和促进免疫的功能恢复方面,含有甘草的药组作用较好;而柴芍组的胸腺指数显著低于模型组($P < 0.01$),说明柴胡与芍药的配伍加重了胸腺的损伤,但在两药基础上配伍甘草后(柴芍甘组),治疗作用则明显增强,进一步说明甘草与其他药物配伍有很好的协调作用。

脾脏是机体最大的免疫器官,含有大量的淋巴细胞和巨嗜细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心。实验结果表明,模型组大鼠脾脏指数明显高于正常组($P < 0.01$);四逆散能明显增加脾脏质量,提高脾脏指数。拆方研究表明,与模型组比较,四逆散组和柴枳甘组的脾脏指数显著增高,其余各药组均呈现作用增强的趋势,但与模型组相比无显著性差异;与四逆散组相比,柴枳甘组的作用无显著性差异,其余各药组显著低于四逆散组,说明在增加脾脏质量,提高脾脏指数方面,柴胡、枳实、甘草在方中发挥主要作用。

目前认为 NF- κ B 活化异常是 UC 的病理生理学机制之一^[5],在 UC 的免疫和炎症因素方面起重要作用,可以通过检测其表达水平的强度对 UC 的病情进行评估及治疗效果的判断^[6]。p65 是 NF- κ B 的主要亚基,可以用来反应 NF- κ B 是否转运到胞核内,从而确定 NF- κ B 活性。实验结果显示:模型组大鼠结肠组织 NF- κ Bp65 活性明显高于正常组($P <$

0.01);拆方研究表明,与模型组比较,各药物组均呈下降趋势,除柴甘组和枳甘组外,其余各组均显著降低,以四逆散组最为明显,且与其他组之间的差异有统计学意义;在其他药组中,柴芍枳组和柴芍组的作用尤为显著。说明四逆散能够抑制 NF- κ B 的激活,柴胡、芍药的作用明显。

本实验研究结果表明四逆散能够干预实验性 UC,其作用可能是通过刺激免疫器官分泌免疫细胞,抑制 NF- κ B 的激活来实现的;四逆散对实验性 UC 作用以全方作用最为理想,其中,柴胡、芍药在发挥了君药与臣药的重要配伍作用,甘草作为使药,其协调作用主要体现在对胸腺细胞增殖的刺激上。

[参考文献]

- [1] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版,北京:人民卫生出版社,2002:1335.
- [2] Wang T, Wang Y, Wu M C, et al. Activating mechanism of transcription NF-Kappa B regulated by hepatitis B virus X protein hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(3):356.
- [3] 郑礼,高振强,王淑仙. 大鼠 UC 模型的实验研究[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(4):370.
- [4] Tjandra K, Le T, Swain M G. Experimental colitis attenuates development of toxin-induced cholangitis in rats [J]. Dig Dis Sci, 2002, 47(6):1216.
- [5] 梁海清,李俊玲,王世和. NF- κ B 在 UC 中的作用[J]. 国际消化病杂志, 2008, 28(1):40.
- [6] 陈吉,高美丽,白晓茹,等. 核因子- κ B 和细胞因子在 UC 中的表达及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(2):209.

[责任编辑 聂淑琴]