

白头翁加味汤调节溃疡性结肠炎大鼠血清白介素-4 和肠黏膜环氧合酶-2 的研究

殷刚峰, 卜平*, 朱海航
(扬州大学临床医学院, 江苏 扬州 225001)

[摘要] 目的: 观察白头翁加味汤对溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠血清白介素-4(IL-4)以及肠黏膜环氧合酶-2(COX-2)的影响, 探讨白头翁加味汤对 UC 的作用机理。方法: 采用局部刺激法建立大鼠 UC 模型, 将 50 只大鼠随机分为空白组、模型组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组、白头翁加味汤高剂量组和低剂量组。造模后给药 7 d, 观察并计算疾病活动指数(DAI), 检测各组大鼠血清 IL-4 以及肠黏膜 COX-2。结果: 与模型组相比, 白头翁加味汤高、低剂量组 DAI 有明显改善($P < 0.05$), IL-4 含量明显升高($P < 0.05$), COX-2 含量明显降低($P < 0.05$)。结论: 白头翁加味汤可能通过升高 IL-4, 减少 COX-2 的合成而减轻炎症反应, 促进溃疡的愈合。

[关键词] 白头翁加味汤; 溃疡性结肠炎; 白介素-4; 环氧合酶-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)12-0084-03

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)属于炎症性肠病, 是消化系统难治疾病之一, 临床上以腹痛、腹泻和脓血黏液便, 内镜下以结肠黏膜溃疡糜烂为主要表现。其发病率在西方国家较高, 在我国也有增高的趋势。现代医学对本病多采用柳氮磺胺吡啶结合皮质激素治疗, 但疗效并不理想^[1]。白头翁加味汤经扬州大学医学院卜平教授在临床治疗溃疡性结肠炎疗效显著, 故本文选用 UC 模型大鼠探讨白头翁加味汤治疗 UC 的作用效果及机理。

1 材料

1.1 实验动物 SD 大鼠 50 只, 体重(180±20)g, 雄性, 标准饲料喂养(浙江省实验动物中心 SCXK(浙)2003-0001)。

1.2 药品、试剂 白头翁加味汤各味中药购自扬州永发医药大卖场, 经扬州市药检所主任技师闻郦毓老师鉴定。白头翁加味汤由白头翁 15 g, 黄柏 12 g, 黄连 6 g, 秦皮 12 g, 生黄芪 9 g, 焦白术 9 g, 炒槐花 12 g, 地榆 9 g, 附片 4.5 g 组成。煎煮前浸泡 30 min, 自动煎药机煎煮 2 次, 每次 30 min, 滤液 80℃水浴浓缩至含生药 0.77 g·mL⁻¹和 3.85 g·mL⁻¹, 高压灭菌消

毒分装, 4℃冰箱保存备用; SASP: 上海三维公司生产, 批号: 200712c13, 临用前配制成 72 mg·mL⁻¹; 5% TNBS: sigma 公司; 白介素-4(IL-4)ELISA 试剂盒: ADL (ADLITERAM DIAGNOSTIC LABORATORIES) 公司; 兔抗鼠环氧合酶-2(COX-2)多克隆抗体、SABC 试剂盒及 DAB 显色剂购自北京博奥森生物技术有限公司; 便隐血胶体金检测试纸(商品名: 消康保 万华普曼生物工程有限公司)。

1.3 主要仪器 DK-600B 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); YFT20 型中药煎药机(北京东华原医疗设备有限责任公司); 5804R 低温离心机(EPPENDORF 公司); JEDA801D 形态学图像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 造模 根据文献^[2]造模, 造模剂为 5% TNBS 与无水乙醇以体积 1:1 配成含有 TNBS 25 mg·mL⁻¹混合液; 50 只大鼠禁食不禁水 24 h 后, 2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉(45 mg·kg⁻¹); 随机挑选 40 只麻醉状态大鼠, 经肛门轻柔插入直径 0.2 cm 的塑料导管 8 cm, 用 2 mL 注射器缓慢注入造模剂(100 mg·kg⁻¹即 4 mL·kg⁻¹), 然后再注入长约 0.3 mL 的空气; 剩余 10 只麻醉大鼠, 经肛门轻柔插入直径 0.2 cm 的塑料导管 8 cm, 用 2 mL 注射器缓慢注入 4 mL·kg⁻¹生理盐水, 然后再注入长约 0.3 mL 的空气。

2.2 分组给药 40 只造模大鼠随机分为 4 组, 分组

[收稿日期] 2009-03-23

[基金项目] 江苏省科技厅“十五”重点攻关项目(BS2002022)

[通讯作者] * 卜平, Tel: (0) 13013705931; E-mail: boping@yzu.edu.cn

及给药剂量如表 2。造模 24 h 后按公斤体重给药,白头翁加味汤低剂量组 ($7.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及 SASP 组 ($0.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 均为人等效剂量;白头翁加味汤高剂量组 ($38.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 为低剂量组浓度的 5 倍,空白对照组与模型组每日给予同体积生理盐水, ig 1 次/d, 连续 1 周,均以普通灭菌饲料喂养。

2.3 观测指标

2.3.1 疾病活动指数(DAI) 每天观察动物的体重、大便粘稠度和大便出血情况,评分标准见表 1,DAI 综合评分为以上 3 项评分的平均值,介于 0~4 分之间,0 分代表正常,4 分代表最大炎症^[3]。

表 1 DAI 评分标准

观察指标	DAI 计算				
	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
体重下降	不下降	下降 > 1% ~ 5%	下降 > 5% ~ 10%	下降 > 10% ~ 15%	下降 > 15%
大便形状	正常	—	松散但不附着肛周	—	腹泻
大便隐血	阴性	—	阳性	—	肉眼血便

2.3.2 血清 IL-4 含量测定 给药 1 周后,大鼠禁食不禁水 24 h 后全部杀检。麻醉大鼠,下腔静脉采血 4 mL 左右,置无菌试管中,室温静置,自然凝固收缩后,以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清,保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,ELISA 试剂盒检测 IL-4 含量。

2.3.3 肠黏膜 COX-2 免疫组化光密度测定 处死大鼠后,取 3.0~4.0 cm 远端结肠于 10% 中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,4~5 μm 连续切片,免疫组化染色 COX-2 采用 SABC 法(一抗前采用高压修复方法),经 DAB 显色,苏木素复染,常规脱水,中性树脂封片。阴性对照用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 代替一抗。结果判定标准:细胞浆呈黄色或棕黄色为阳性,无着色为阴性;每张切片至少随机观察 5 个高倍视野下的面积,用捷达图像分析仪分析每个高倍视野下阳性物质的平均光密度,取其均值。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件处理,实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,根据方差齐性采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 DAI 比较 模型组、白头翁加味汤高、低剂量组 SASP 组在造模后第 1 d 即出现疾病发作,模型组在整个实验过程中炎症持续,无明显自愈倾向;白头翁加味汤高、低剂量组和 SASP 组在治疗后第 5 d 开始出现 DAI 下降趋势,实验终点时均有

好转。造模后第 7 d,与模型组比较,白头翁加味汤高、低剂量组及 SASP 组 DAI 均下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1),提示白头翁加味汤可改善大鼠溃疡性结肠炎症状。

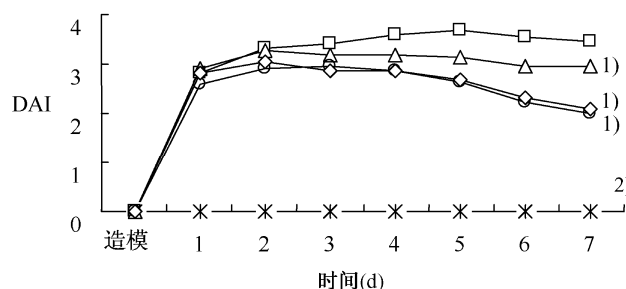


图 1 各组大鼠 DAI 比较

□模型组, △SASP 组, ◇白头翁加味高剂量组, ○白头翁加味低剂量组, * 空白组

造模后第 7 d 与模型组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3.2 各组大鼠血清 IL-4 含量比较 表 2 结果表明,模型组血清 IL-4 含量比空白组显著下降 ($P < 0.01$);与模型组相比,白头翁加味汤高、低剂量组均有明显升高 ($P < 0.05$);白头翁加味汤两剂量组之间无统计学差异。

表 2 各组大鼠血清 IL-4 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	IL-4 含量 ($\text{Pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白组	—	10	$635.50 \pm 110.17^{2)}$
模型组	—	8	74.50 ± 35.34
SASP 组	0.72	8	$220.25 \pm 49.16^{1)}$
白头翁加味汤组	7.7	8	$391.13 \pm 44.08^{1)}$
	38.5	7	$399.14 \pm 48.52^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.3 各组大鼠肠黏膜 COX-2 表达的比较 表 3 实验结果表明,模型组肠黏膜 COX-2 含量比空白组显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,白头翁加味汤高、低剂量组均有明显降低 ($P < 0.05$),白头翁加味汤两剂量组之间无统计学差异。

表 3 各组大鼠肠黏膜 COX-2 免疫组化光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	OD 值
空白组	—	10	$0.075 \pm 0.024^{2)}$
模型组	—	8	0.414 ± 0.024
SASP 组	0.72	8	$0.373 \pm 0.026^{1)}$
白头翁加味汤组	7.7	8	$0.322 \pm 0.029^{1)}$
	38.5	7	$0.331 \pm 0.024^{1)}$

4 讨论

IL-4 是 T 细胞来源的细胞因子, 具有多种生物学功能, 最令人关注的是其抑制炎症的特性, 正常人十二指肠黏膜的淋巴细胞比外周血淋巴细胞能自发地分泌更多的 IL-4, 表明 IL-4 对维持肠道免疫起重要作用。

环氧合酶(COX)为花生四烯酸转化为前列腺素代谢中的关键酶, 它包括 COX-1 和 COX-2 两种异构体。COX-2 是在各种刺激因子作用下激活表达的诱导酶, 其合成的是炎症性前列腺素, 仅存在于组织损伤、炎性、肿瘤组织中, 被认为与炎症、有丝分裂和特殊的信号传导有关。有研究显示, 炎症黏膜上皮细胞及结肠固有层单核炎性细胞表达 COX-2; 且在炎症活动期结肠固有层和肌间神经丛中 COX-2mRNA 表达水平明显高于非活动期^[4]。多种致炎细胞因子可诱导 COX-2 在炎症、癌前病变、肿瘤组织中表达增高, 但是 COX-2 在 UC 中的具体作用尚未阐明。研究表明, 所有 UC 肠黏膜中 COX-2 均呈高表达, 并且在炎症细胞聚集的部位 COX-2 表达呈强阳性, 而正常结肠黏膜中仅有少量低表达, 与多数文献报道一致。

Stefan^[5] 研究发现, IL-4 对前列腺素 E₂ 有抑制作用, 从而抑制炎症, 促进溃疡愈合。COX-2 是前列腺素 E₂ 合成的关键酶, 在正常组织中少表达, 在炎症性肠病及结肠肿瘤中高表达。方维丽^[6] 在研究中发现, UC 模型组中 COX-2 与前列腺素同时增高, 可能机制是 COX-2 的上调导致了前列腺素的上调, 从而导致炎症的发生发展。我们的研究结果提示: 当 IL-4 升高时, COX-2 下调; 当 IL-4 下调时, COX-2 上升。

所以我们推断: IL-4 可能通过抑制前列腺素 E₂ 合成关键酶 COX-2 的表达, 导致前列腺素 E₂ 合成减少, 从而使肠粘膜炎症减轻, 病情好转。本实验中 IL-4 在白头翁高低治疗组中较高, 在模型组及 SASP 组中较低, 而 COX-2 则刚好相反, 推测: 白头翁加味汤可能通过升高 IL-4 抑制前列腺素合成的关键酶 COX-2 在溃疡性结肠炎黏膜中的表达, 从而限制了前列腺素 E₂ 在肠黏膜中的合成, 从而缓解炎症, 达到治疗效果。

[参考文献]

- [1] 许国铭, 李石. 现代消化病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 911, 917.
- [2] 陈英群, 董福轮. 三硝基苯磺酸诱导大鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2006; 12: 27(6): 31-33.
- [3] Steidler L, Hans W, Schotte L, *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin 10 [J]. *Science*, 2000, 289: 1352-1355.
- [4] Roberts PJ, Morgan K, Miller R, *et al.* Neuronal COX-2 expression in human myenteric plexus in active inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 2001, 48: 468-472.
- [5] Stefan S, Thomas H, Uif P, *et al.* Impaired response of activated Mononuclear phagocytes to IL-4 in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 1995, 108: 21.
- [6] 方维丽, 王邦茂, 刘心娟. 环氧合酶 2 和前列腺素在溃疡性结肠炎中的作用[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(9): 652.