

中药灌肠 I 号对小鼠结肠炎治疗作用 及免疫学机制研究

刘萍¹, 安晓霞², 李燕², 董波², 孙淑华², 莘旭妮², 毛建平², 崔玉芳^{2*}

(1. 解放军总医院中药房, 北京 100853; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的: 比较中药方灌肠 I 号与西药柳氮磺胺吡啶(SASP)对 2,4-二硝基氯苯(DNCB)和乙酸(AA)复合法诱导的小鼠溃疡性结肠炎(UC)模型的治疗效果, 并探寻 UC 发病机制。方法: 将小鼠随机分为正常组、模型组、SASP 组及灌肠 I 号治疗组 4 组, 用肠道积分法评定组织学变化; 用流式细胞仪检测各组外周血、肠系膜淋巴结中 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞的变化。结果: 模型组小鼠肠道组织学评分明显高于正常组, 而结肠长度明显较正常组缩短; 模型组 CD3⁺、CD4⁺ 细胞较正常组明显降低($P < 0.01$)。经 SASP 和灌肠 I 号灌肠治疗后, 在肠道炎症和病理损伤明显减轻的同时, 肠道组织学评分较模型组明显降低($P < 0.01$), 结肠长度与正常组基本接近, 且 CD3⁺、CD4⁺ 细胞亚群较模型组明显增高($P < 0.01$)。结论: 灌肠 I 号对 DNCB-AA 诱导的小鼠 UC 模型治疗取得了满意效果, 可作为 UC 发病机制的研究及治疗的较理想药物。

[关键词] 2,4-二硝基氯苯; 结肠炎; 柳氮磺胺吡啶; 灌肠 I 号

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)07-0063-04

Influence of Clyster No. 1 on the Express of Immunologic Targets of Mice with Ulcerative Colitis

LIU Ping¹, AN Xiao-xia², LI Yan², DONG Bo², SUN Shu-hua²,
SHEN Xu-ni², MAO Jian-ping², CUI Yu-fang^{2*}

(1. General Hospital of PLA, Beijing 100853, China;

2. Department of Immunology, Institute of Radiation Medicine, AMMS, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the therapeutic effects of Clyster No. 1 (CN1, the Pulsatillae decoction) with salazosulfapyridine (SASP) to the ulcerative colitis (UC) model induced by dinitrochlorobenzene (DNCB)-acetic acid (AA) in mice, to research the pathogenesis. **Methods:** KM mice were randomly divided into four groups: normal control group, experimental colitis model group, SASP group and CN1 therapeutic group. Proportions of CD3⁺、CD4⁺ T cell, in mesenteric lymph node and peripheral blood of each group were estimated by flow cytometry; and histological changes were evaluated by HE staining and histological score of intestine. **Results:** Compared with normal control group, the histological score was markedly higher and the length of colon became shorter in model group of experimental colitis. The proportion of CD3⁺、CD4⁺ T cells were markedly decreased ($P < 0.01$) in model group compared with the control group. After two weeks' treatment with SASP and CN1, the histological score was reduced, the length of colon recovered almost to normal level, accompanied with increasing in the proportion of CD3⁺、CD4⁺ T cells compared with the model group. **Conclusions:** The effect was satisfactory for the UC mice treated with CN1 and it may serve as a tool for investigation of the pathogenesis and therapeutical effect for UC.

[收稿日期] 2007-09-21

[通讯作者] * 崔玉芳, Tel: (010) 66931353; E-mail: yufangc@vip.sina.com。

[**Key words**] dinitrochlorobenzene; ulcerative colitis; salazosulfapyridine; Clyster No. 1

炎性肠病(IBD) 是在感染、免疫、环境、遗传等多因素的作用下发病的。溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病(crohn's disease, CD) 均属 IBD。有关 UC 治疗的研究当前日益受到重视, 由于对于 UC 的病因和发病机制目前仍不十分清楚^[1], 治疗上有很大难度。我们已通过组织免疫学验证法成功建立了 2, 4-二硝基氯苯(DNCB) 结合乙酸(AA) 法诱导的小鼠结肠炎动物模型, 本实验用我们的专利组合中药方灌肠 I 号(Clyster No. 1, CN1)^[2] 与柳氮磺胺吡啶(SASP) 实施 UC 模型小鼠灌肠治疗观察, 旨在进行疗效比较和干预机制的研究。

1 实验材料

1.1 药物和试剂 CN1(主要药味为白头翁: 黄连: 秦皮: 黄柏: 紫草: 仙鹤草: 诃子: 茜草: 青黛: 白及。各药味比例= 2. 5: 1: 2: 2: 2. 5: 2. 5: 1: 2. 5: 2. 5: 2. 5), 解放军总医院中药房通过水煮醇沉工艺, 过滤灭菌灌装生产, 最终浓度为含生药 $0.7 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以秦皮甲素、小檗碱作为质控指标。批号: 070205)。大鼠抗小鼠 FITC-CD4, Percp-CD3, PE-CD29 购自 Biologend 公司, 红细胞裂解液购自 BD 公司, 硫化钠、2, 4-二硝基氯苯(DNCB) 和乙酸(AA) 购自北京化学试剂公司, (均为分析纯); SASP 购自上海三维制药有限公司(批号: 200609C12)。

1.2 仪器 流式细胞仪(型号: FACS Calibur; 美国 Becton Dickinson 公司生产)。

1.3 实验动物 KM 小鼠 46 只, 体重(28~ 35) g, 雌雄各半, 由军事医学科学院实验动物中心提供(实验动物合格证号: SCXK-(军) 2002-001)。以上动物均饲养在本院二级动物房。

2 方法

2.1 分组及模型建立 KM 小鼠按体重随机分为 4 组: 正常组 10 只, 模型组、SASP 组、及 CN1 治疗组各 12 只。除正常组外, 小鼠均采用 DNCB 和 AA 复合法提前 2 周诱发溃疡性结肠炎模型^[3]。

2.2 实验治疗及给药途径 建模 1 周后, 正常组和模型组均以等体积 2 mL 蒸馏水灌肠; SASP 组以蒸馏水配制的 SASP($200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 灌肠, 每次 0. 25 mL, 1 次/d, 6 只给药 1 周, 另 6 只给药 2 周; 治疗组用 CN1 灌肠, 每次 2 mL, 1 次/d, 6 只给药 1 周, 另 6 只给药 2 周。

2.3 一般表现和病理学观察 治疗期间, 观察小鼠进食、排便、精神和体重等情况。各组均于给药后 1 和 2 周处死小鼠, 留取结肠组织入 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 常规 HE 染色, 观察结肠组织病理学改变。

2.4 外周血和肠系膜淋巴结细胞悬液制备 活杀前从小鼠眼眶取血(0. 8~ 1) mL, 肝素抗凝。0. 1 mL 用作流式细胞仪分析^[4], 其余用淋巴细胞分离液分离后制备淋巴细胞悬液, 离心、涂片。处死小鼠后迅速摘取肠系膜淋巴结, 剥离干净脂肪组织后置于预冷的无血清 RPMI 1640 液中, 用 200 目不锈钢筛网上冰浴中研磨, 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 10^8 mL^{-1} , 0. 1 mL 用作流式细胞仪分析, 其余制作细胞悬液, 离心、涂片。

2.5 T 细胞亚群表面标志的流式细胞仪分析 取肝素抗凝的外周血和制备的肠系膜淋巴结细胞悬液各 100 μL , 置于流式专用管中, 分别加入上述荧光素标记的抗体, 其中 FITC-CD4、Percp-CD3 各 4 μL , PE-CD29 4. 5 μL 室温避光孵育 30 min 后, 外周血样品中加入红细胞裂解液(1: 9 稀释) 2 $\text{mL} \cdot \text{管}^{-1}$, 室温放置 15 min。所有样品均于 $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 弃上清, 冷 PBS 液 3 mL 洗 2 次, 最后用 0. 5 mL PBS 重悬, 上机检测。

2.6 肠道组织学损害评分 评分标准^[5] 为 0 分: 无明显炎症; 1 分: 少量淋巴细胞浸润($\leq 10\%$ 高倍视野), 并无结构的改变; 2 分: 中量淋巴细胞浸润($10\% \sim 25\%$ 高倍视野), 隐窝变长, 肠壁增厚, 但未透过黏膜层, 无溃疡形成; 3 分: 明显淋巴细胞浸润($25\% \sim 50\%$ 高倍视野), 血管密度增加, 肠壁增厚, 透过黏膜层; 4 分: 大量淋巴细胞浸润($\geq 50\%$ 高倍视野), 血管密度增加, 隐窝变长并扭曲, 肠壁全层增厚, 可见溃疡形成。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 软件包, 进行方差分析和 *t* 检验。

3 实验结果

3.1 一般情况 建模后 1 d 除正常组外, 各组均出现精神萎靡、懒动, 体重明显下降。(1~ 3) d 左右先后出现黏液便、黏液脓便及黏液血便。治疗(1~ 2) 周后, 临床症状及肠道炎症明显减轻。

3.2 病理学观察 大体观察可见, 模型组小鼠出现明显脓血样便(见图 1 A), 结肠病变主要集中在远端

结肠,其结肠长度明显缩短($P < 0.05$), (见图 1 B)。大体标本可见结肠黏连、狭窄、近段结肠扩张,黏膜充血、糜烂、溃疡和脓肿形成(见图 1 C)。显微镜观察模型组可见小鼠结肠黏膜炎性细胞浸润明显增多(见图 2A),杯状细胞减少甚至消失,肠绒毛结构破

坏,结肠黏膜缩短,肠腺结构紊乱(见图 2B)。SASP 组(图 2C)及 CN1 组(图 2D)治疗 2 周后结肠损伤程度明显减轻,如炎性细胞浸润明显减少,杯状细胞明显再生,绒毛排列整齐(见图 2C、D),肠腺结构接近于正常组织(见图 2E)。



A. UC 模型组小鼠血便; B. 结肠长度(上)较正常(下)明显缩短; C. 结肠黏膜脓肿和溃疡形成
图 1 UC 模型小鼠的病理表现

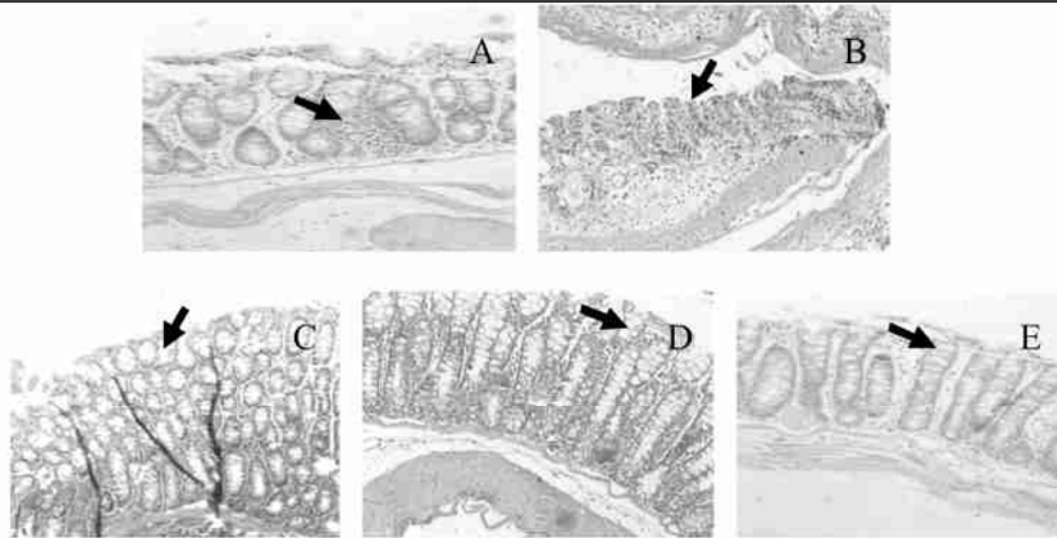


图 2 UC 模型小鼠及 SASP 和 CN1 治疗组结肠黏膜的病理改变

1. UC 模型组小鼠结肠黏膜炎性细胞浸润明显(A), 结肠黏膜缩短, 肠腺结构紊乱(B); 2. SASP(C) 和 CN1 (D) 治疗 2 周后结肠炎性细胞浸润明显减少, 绒毛排列整齐, 杯状细胞明显再生; 治疗后肠腺结构接近于正常组织(E)。

3.3 结肠组织学损害评分 表 1 模型组 2 项指标均显示小鼠肠道病理改变较正常组明显加重, 而经过 SASP 和 CN1 治疗后症状明显减轻, ($P < 0.001$)。

3.4 T 细胞亚群的变化

3.4.1 外周血 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞亚群的变化 与正常组比较, 模型组 CD3⁺、CD4⁺ 细胞明显降低($P < 0.01$)。CN1 治疗 2 周后, CD3⁺、CD4⁺ 细胞亚群较模型组增高($P < 0.05$), 基本达到或接近正常水平(见图 3)。

表 1 组织学损害评分及结肠长度的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Histological score and changes of the length of colon($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($\text{mL} \cdot \text{d}^{-1}$)	治疗持续时间 (周)	组织学损害 评分	结肠长度 (cm)
正常组	—	—	$0.33 \pm 0.01^{(3)}$	$14.2 \pm 0.36^{(1)}$
模型组	2	1	4.78 ± 0.17	11.3 ± 0.51
SASP 组	$50 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$	1	$2.15 \pm 0.31^{(3)}$	$13.0 \pm 0.50^{(3)}$
CN1 组	2	1	$2.11 \pm 0.24^{(3)}$	$13.6 \pm 0.69^{(3)}$
模型组	—	2	3.67 ± 0.19	12.3 ± 0.58
SASP 组	$50 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$	2	$1.61 \pm 0.50^{(3)}$	$13.5 \pm 0.29^{(3)}$
CN1 组	2	2	$1.67 \pm 0.44^{(3)}$	12.6 ± 0.11

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (下同)

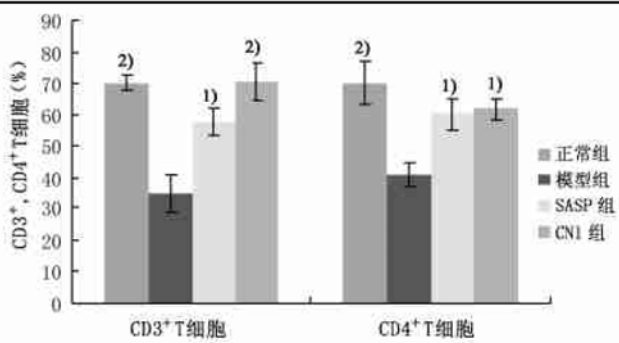


图 3 CN1 治疗 2 周后外周血 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞亚群的变化

3.4.2 肠系膜淋巴结 CD3⁺、CD4⁺ 细胞亚群的变化
与正常组比较,模型组 CD3⁺、CD4⁺ 细胞降低的趋势与外周血相似($P < 0.01$)。经 CN1 治疗 2 周后,CD3⁺、CD4⁺ 细胞亚群均较模型组明显增高($P < 0.05$),达到正常组水平(见图 4)。

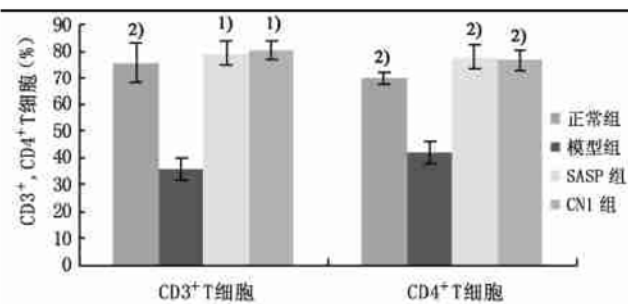


图 4 CN1 治疗 2 周后小鼠淋巴结 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞亚群的变化

4 讨论

CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的比例失调可能在 IBD 的发病和病程中起重要作用^[6,7]。本实验在以往实验基础上,应用更接近于人 UC 免疫学发病特点的 DNCB+ AA 复合法^[7] 诱发的小鼠 UC 模型,观察了经 SASP 和中药 CN1 治疗后,CD3⁺、CD4⁺ T 细胞亚群在其中的变化。

结果显示,在外周血和肠系膜淋巴结中,模型组 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞亚群的数量均较正常组显著减少,而经过 CN1 治疗后显示明显的上升。与模型组比较,经 CN1 治疗后,外周血和肠系膜淋巴结 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 细胞也出现明显增加(另文报道)。从实验可以看出,使用较理想的动物模型能够为治疗机制、药理学和临床研究提供更有价值的实验和理论依据。

中药 CN1 为古代名方白头翁汤加味而成,白头翁汤清肠腑湿热,仙鹤草收敛止血、止痢、补虚强壮,紫草凉血活血、解毒透疹,茜草活血化瘀、凉血止血,诃子涩肠止泻,白及消肿生肌,青黛清热解毒,数药合用,全方配伍,可共奏清热解毒、凉血止痢、活血强壮之功。从现代药理作用分析,其主要机制可能是抑制病理性亢进的免疫环节,然而由于中药特殊而复杂的药效和机体复杂的免疫调节机理,中药对此类疾病的治疗机制还远未阐明。本实验结果显示,中药 CN1 与 SASP 具有相似的疗效,但不良反应远远比其要小,价格也要低廉许多^[8],很有开发研究前景。

[参考文献]

[1] 江学良,崔慧雯. 溃疡性结肠炎[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005. 1-2, 104-119.

[2] 刘萍,罗庆良,马凤彩,等. 一种治疗溃疡性结肠炎的药物组合物及其制备方法[P]. 专利批准号: ZL200410073952.

[3] 安晓霞,李燕,董波,等. DNCB 复合法诱导建立小鼠结肠炎模型与免疫学方法的验证[J]. 感染、炎症、修复, 2008, 9(1): 30-32.

[3] Zr Bing Wang, Yur Fang Cui, Yur Qing Liu, et al. Increase of CD4⁺ CD25⁺ T Cells in Smad3^{-/-} Mice[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(15): 2455-2458.

[4] 靳巍,徐菡,崔玉芳,等. 流式细胞仪检测小鼠 Th1, Th2 型细胞因子的表达[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(专刊): 71-72.

[5] Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114: 385-391.

[6] 刘萍,杨洁,余祖胤,等. 灌肠 I 号对炎症肠病大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(11): 1230-1233.

[7] 崔玉芳,徐菡,安晓霞,等. T 辅助细胞亚群与炎症性肠病的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(20): 2464-2468.

[8] 张振书,周殿元. 溃疡性结肠炎的内科治疗[J]. 胃肠病学, 2004, 9(4): 251-254.