

加味四逆散对溃疡性结肠炎肝郁大鼠 模型细胞因子网络的调节作用

谷松^{1*}, 郭晓东¹, 关庆增¹, 岳志军², 明彩荣¹, 林庶茹¹

(1. 辽宁中医学院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医学院附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 观察加味四逆散对溃疡性结肠炎(UC)肝郁大鼠模型细胞因子(CK)网络的调节作用, 揭示加味四逆散治疗肝郁证 UC 的部分现代生物学基础。方法: 采用免疫法及束缚法的复合因素制作 UC 肝郁大鼠模型, 检测加味四逆散各剂量组与模型组血清 IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10 的水平, 统计学进行分析。结果: 加味四逆散各剂量组的 IL-1 β 、IL-6 水平较模型组均明显降低, IL-4、IL-10 的水平均明显升高。结论: 加味四逆散治疗肝郁证 UC 的途径之一, 可能是抑制了 UC 肝郁时 IL-1 β 、IL-6 等炎性 CK, 上调了 IL-4 和 IL-10 等抑炎性 CK, 从而调节 CK 网络, 纠正异常的免疫功能, 降低免疫细胞对炎症的反应性, 从而有利于炎症的消除及组织的修复。

[关键词] 加味四逆散; 溃疡性结肠炎; 肝郁证; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)03-0056-03

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种非特异性炎症肠病,也是当前中医药界在消化胃肠领域所关注的热点之一^[1]。其发病与免疫功能紊乱有关已得到普遍认可,而具有免疫调节作用的细胞因子(cytokines, CK)在 UC 的发病过程中起重要作用。CK 在体内形成 CK 网络,相互协调、抑制而发挥着不可替代的作用。我们在临证中使用调畅气机法为主的加味四逆散治疗肝郁证 UC 取得了良好的效果。本文观察了加味四逆散对 UC 肝郁大鼠模型血清 IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10 水平的影响,探讨该方对 UC 肝郁大鼠模型 CK 网络的调节作用,初步揭示该方治疗 UC 的部分现代生物学基础。

1 材料与方

1.1 动物及药物 健康雄性 Wistar 大鼠,体重 240g~300g,由辽宁中医学院实验动物中心提供。加味四逆散:由柴胡、白芍、枳壳、炙甘草、薤白、酒大黄、败酱组成,用药比例为 3:3:3:3:3:1:2,由辽宁中医学院附属医院提供,加水煎煮后浓缩为含生药 1g/mL 溶液。柳氮磺吡啶(SASP):0.25g/片,上海三维制药有限公司生产。批号:沪卫药准字(1995)第 002083 号。

1.2 主要试剂及仪器 2,4,6-三硝基苯磺酸

(TNBS):Sigma 公司提供。IL-1 β 、IL-6 试剂盒:北京邦定泰克生物技术有限公司提供。Milli-Q 型超纯水机,美国 MILLIPORE 制造;BENCHMAR 型酶标仪, BIO-RAD 制造;1575 型洗板机, BIO-RAD 制造。

1.3 造模方法 采用免疫法^[2]及束缚法^[3]的复合因素加以改进:每天将大鼠四肢不定时捆绑 8 小时左右,限制其自由活动(自由饮食、饮水)。第 2 周开始,大鼠禁食 24h(不禁水),10%水合氯醛腹腔麻醉后,将 TNBS/乙醇液(100mg/kg TNBS + 50%乙醇 0.25mL)由大鼠肛门轻缓注入深约 8cm 肠腔内。UC 造模成功后每日仍持续束缚。

1.4 分组、给药及取材 将 48 只大鼠随机分为 6 组:正常组、模型组、SASP 组、加味四逆散大、中、小剂量组,每组 8 只。SASP 组:灌胃给予 SASP 混悬液 0.3g/kg 体重;加味四逆散大、中、小剂量组:分别灌胃给药 2.2g/kg、6.5g/kg、19.5g/kg 体重;正常组及模型组均灌胃生理盐水 1mL/100g 体重。UC 造模后第 2 天各组开始灌胃,每日 1 次。第 21d 动物处死,腹主动脉无菌取血,经 3500r/min,15min 低温离心,分离血清 500 μ L。

1.5 血清 IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10 水平测定方法 双抗体夹心 ABC-ELISA 法:严格按试剂盒说明书操作。

1.6 病理切片制作方法 修取病变最明显处结肠组织,用 10% 甲醛固定 24h 后进行漂洗,逐级酒精脱

[收稿日期] 2005-09-14

[通讯作者] 谷松, Tel: (024) 31207190; E-mail: songgu03@sohu.com

水,二甲苯透明,石蜡包埋;5 μ m 厚切片,苏木精-伊红染色,中性树脂胶封片,光镜下观察。

1.7 统计学处理 实验数据经 SPSS10.0 软件处理,进行 One-Way 方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 模型组:束缚法肝郁造模后逐渐出现胡须下垂,叫声尖细,贴边,扎堆,反应迟缓,活动及饮食减少等。UC 造模后的第 2 天即出现稀便,随后相继出现粘液便、脓血便,伴有饮食减少、倦怠懒动、消瘦、喜扎堆、拱背、竖毛、毛不光洁,有拖尾现象。

治疗组:上述症状均有不同程度的改善,用药 1 周后大便开始好转,2 周后脓血便减少,第 3 周时上述症状基本消失。其中加味四逆散中、大剂量组总体上优于 SASP 组。

2.2 对 UC 肝郁大鼠模型血清 IL-1 β 、IL-6 水平的影响 加味四逆散各剂量组的 IL-1 β 、IL-6 水平较模型组均明显降低,其中中剂量组更接近正常组。结果见表 1。

表 1 加味四逆散对 UC 肝郁大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g/kg)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常组	—	5.74 \pm 1.40	12.51 \pm 2.06
模型组	—	13.95 \pm 3.29 ³⁾	46.48 \pm 4.92 ³⁾
SASP 组	0.3	10.20 \pm 2.00 ^{1,2)}	27.54 \pm 5.32 ^{1,2)}
加味四逆散小剂量组	2.2	10.29 \pm 1.68 ^{1,2)}	29.04 \pm 4.51 ^{1,2)}
加味四逆散中剂量组	6.5	6.70 \pm 1.68 ^{1,4)}	16.60 \pm 3.52 ^{1,4)}
加味四逆散大剂量组	19.5	8.73 \pm 2.53 ^{1,2)}	19.59 \pm 5.26 ^{1,2,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与正常组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与 SASP 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。(下同)

2.3 对 UC 肝郁大鼠血清 IL-4、IL-10 水平的影响 加味四逆散各剂量组的 IL-4、IL-10 水平较模型组均明显升高,其中中剂量组升高最为明显。结果见表 2。

2.4 病理组织学检查结果 正常组:结肠各层结构清晰,黏膜上皮细胞排列整齐,肠腺规则,极向明显(见图 1)。模型组:造模后第 3 周末,结肠黏膜水肿、充血、隐窝炎及溃疡灶,黏膜下明显水肿,可见大量炎性细胞浸润,呈现慢性炎症特征(见图 2)。加味四逆散小剂量组:溃疡较浅表,溃疡旁上皮修复明显,腺体增生活跃,可见大量急慢性炎细胞浸润(见图 3)。加味四逆散中剂量组:黏膜上皮及腺管排列

整齐,极向明显,间质充血水肿不明显,散见少量淋巴细胞及分叶核细胞(见图 4)。加味四逆散大剂量组:黏膜上皮及腺管排列整齐,极向明显,间质仍可见水肿,并可见较多淋巴细胞及分叶核细胞(见图 5)。SASP 组:溃疡较浅表,溃疡旁上皮修复明显,腺体增生活跃,可见较多急慢性炎细胞浸润(见图 6)。

表 2 加味四逆散对 UC 肝郁大鼠血清 IL-4、IL-10 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g/kg)	IL-4 (ng/mL)	IL-10 (ng/mL)
正常组	—	140.50 \pm 18.65	58.00 \pm 4.47
模型组	—	50.88 \pm 9.36 ²⁾	29.63 \pm 7.03 ²⁾
SASP 组	0.3	78.75 \pm 13.16 ^{1,2)}	87.38 \pm 20.36 ¹⁾
加味四逆散小剂量组	2.2	54.50 \pm 10.90 ¹⁾	44.25 \pm 6.09 ¹⁾
加味四逆散中剂量组	6.5	125.25 \pm 10.39 ^{1,4)}	122.38 \pm 12.66 ^{1,4)}
加味四逆散大剂量组	19.5	95.00 \pm 17.94 ¹⁾	116.13 \pm 13.36 ¹⁾

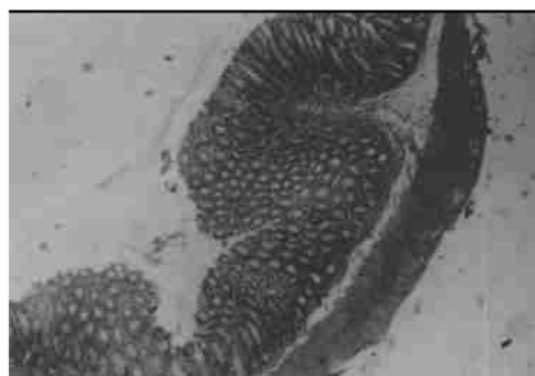


图 1 正常结肠组织

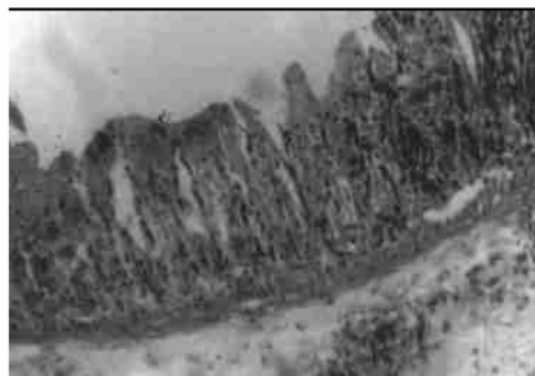


图 2 模型组第 3 周

3 讨论

CK 参与免疫反应和炎症过程,是当前研究 UC 发病机制的热点之一。IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10 作为重要的炎性及抑炎性因子和免疫调节剂,在 UC 的发病中颇受重视^[4,5]。

UC 是以腹泻、黏液脓血便、腹痛和里急后重等为主要症状表现,属于中医“休息痢”的范畴。临床



图 3 加味四逆散小剂量组

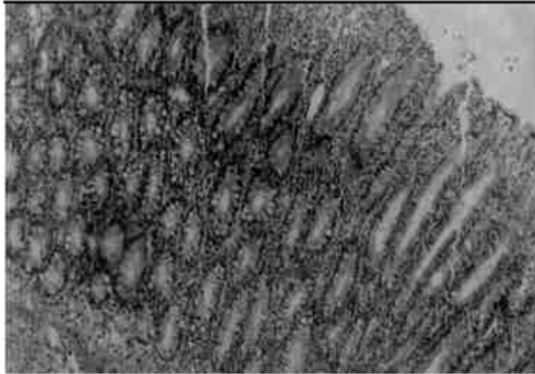


图 4 加味四逆散中剂量组

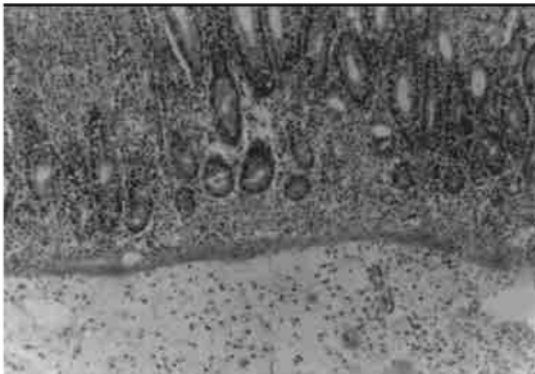


图 5 加味四逆散大剂量组

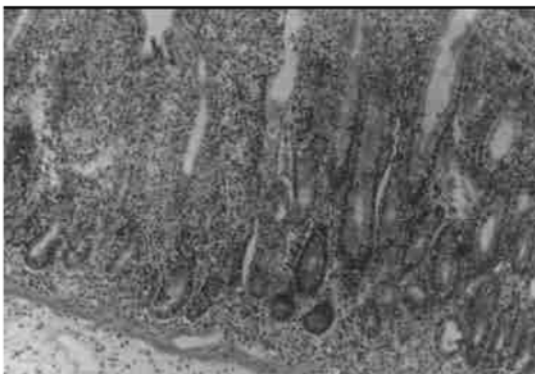


图 6 SASP 组

很多 UC 患者均有程度不同的肝气郁结, 气机不物的现象, 我们在治疗上采用调畅气机辅以清热祛湿兼

活血的方法, 取得满意疗效。加味四逆散在临床治疗 UC, 适用于辨证为肝气郁结, 气机不畅者。四逆散是调畅气机法的代表方剂, 可使肝胆疏泄及脾胃升降恢复正常, 气机调畅, 则湿、热、瘀等邪无由以生; 薤白辛温通阳, 行气导滞; 酒大黄活血、清湿热; 败酱清热解毒。诸药合用, 使气机调畅, 脾升胃降, 气血调和, 经络通利, 则大肠传导功能恢复正常, UC 诸症自除。现代药理研究显示四逆散具有调节免疫功能及抑制炎症的作用; 大黄亦具有免疫抑制作用。

探讨中药复方治疗某一疾病机理的实验研究, 采用病证结合动物模型似更合理, 既能体现中医辨证论治特色, 又能准确地反映中药复方的治疗作用。本实验结果表明, 加味四逆散治疗 UC 肝郁证的途径之一, 可能是抑制了 UC 肝郁时 IL-1 β 、IL-6 等炎性 CK, 上调了 IL-4 和 IL-10 等抑炎性 CK, 调节了 CK 网络, 调整了炎性及抑炎性免疫因子的平衡失调, 纠正了异常的免疫功能, 从而有利于炎症的消除及组织的修复。病理组织学检查结果也支持上述结论。

本实验结果还表明, 加味四逆散治疗 UC 肝郁模型, 小剂量组因有效剂量过小而疗效不佳; 中、大剂量组的疗效优于 SASP, 但两者并未呈现剂量正相关关系, 相反中剂量组的实验指标更接近正常组, 这与中医临床应用调畅气机法治疗疾病时药物剂量宜轻不宜重是相符的。本实验同时也为调畅气机法在临床治疗肝郁证 UC 提供了部分实验依据。

[参考文献]

- [1] 王永炎, 晁恩祥. 今日中医内科[M]. 中卷, 北京: 人民卫生出版社, 2001. 651.
- [2] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, *et al.* Hapten induced models of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96: 795-803.
- [3] 乔明琦, 张惠云, 陈雨振, 等. 肝郁证动物模型研究的理论思考[J]. *中国医药学报*, 1997, 12(5): 42-44.
- [4] 丁伟群, 林庚金, 徐三荣, 等. 溃疡性结肠炎发病中白介素水平的变化[J]. *复旦大学学报(医学科学版)*, 2001, 28(4): 330.
- [5] 刘少平, 董卫国, 吴东方, 等. 当归多糖对免疫性结肠炎大鼠结肠损伤保护作用的研究[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(6): 695.