

芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜免疫屏障的干预作用

吴东升¹, 曹晖^{2*}, 张彧¹, 高亚², 宾东华²

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

[摘要] 目的:探讨芍药汤对 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜免疫屏障的影响。方法:将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,美沙拉嗪组(0.067 g·kg⁻¹),芍药汤低、中、高剂量组(1.8,3.6,7.2 g·kg⁻¹),采用 TNBS 诱导溃疡性结肠炎模型,对应给予生理盐水、美沙拉嗪、芍药汤灌胃治疗 7 d,采用苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学改变,免疫组化法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肠黏膜中 CD4⁺T 淋巴细胞数量和分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠肠黏膜损伤程度评分及病理学评分显著升高($P < 0.01$);CD4⁺T 淋巴细胞,SIgA 蛋白表达显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肠黏膜损伤程度评分及病理学评分显著下降($P < 0.01$),肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞,SIgA 表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与美沙拉嗪组及芍药汤低剂量组比较,芍药汤中、高剂量组肠黏膜损伤程度评分和病理学评分显著下降($P < 0.01$),芍药汤中、高剂量组大鼠肠黏膜中 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。结论:芍药汤可通过增加肠黏膜中 CD4⁺T 细胞数量及 SIgA 分泌的表达,起到减轻肠黏膜损伤,保护肠黏膜免疫屏障功能作用。

[关键词] 芍药汤; 2, 4, 6-三硝基苯磺酸; 溃疡性结肠炎; 肠黏膜免疫屏障; 分泌型免疫球蛋白 A

[中图分类号] R289;R318.14;R516.1;R364.7;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0006-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190936

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190117.1409.017.html>

[网络出版时间] 2019-01-18 15:48

Intervention Effect of Shaoyatong on Intestinal Mucosal Immune Barrier in Rats with Ulcerative Colitis

WU Dong-sheng¹, CAO Hui^{2*}, ZHANG Yu¹, GAO Ya², BIN Dong-hua²

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Changsha 410208, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of TCM, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Shaoyatong on intestinal mucosal immune barrier induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) in rats with ulcerative colitis. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group, mesalazine group (0.067 mg·kg⁻¹), low, medium and high-dose Shaoyatong groups (1.8, 3.6, 7.2 g·kg⁻¹). In the TNBS-induced ulcerative colitis model, saline, mesalazine, peony soup were administered by gavage for 7 days. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the histopathological changes of colon tissue. The number of CD4⁺T lymphocytes and the expression of secretory immunoglobulin A (SIgA) in intestinal mucosa were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Compared with normal group, the scores of intestinal mucosal injury and the pathological scores in model group increased significantly ($P < 0.01$). The expressions of CD4⁺T lymphocytes and SIgA in the intestinal mucosa of model group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, the scores of colonic

[收稿日期] 20181103(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603634);2018年度湖南省中医药科研计划项目(201804);湖南省卫生计生委 2018 年度科研计划课题项目(C20180627);湖南中医药大学校级科研基金项目(ZYYDX201733)

[第一作者] 吴东升,在读硕士,从事肠道慢性疾病合并肛周病变的中医药研究,E-mail:987909401@qq.com

[通信作者] *曹晖,副教授,硕士生导师,从事肠道慢性疾病合并肛周病变的研究,E-mail:caohui001818@sina.com

mucosal damage and the pathological scores decreased significantly in rats ($P < 0.01$). The expressions of CD4⁺T lymphocytes and SIgA in the intestinal mucosa of rats in each group elevated significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with mesalazine group and low-dose Shaoyaotang group, the intestinal mucosal injury score and the pathological scores in medium and high-dose Shaoyaotang groups decreased significantly ($P < 0.01$). The expression levels of CD4⁺T lymphocytes and SIgA protein in the intestinal mucosa of rats in middle and high doses Shaoyaotang groups increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shaoyaotang can reduce the intestinal mucosal damage and protect the intestinal mucosal immune barrier by increasing the number of CD4⁺T cells and the expression of SIgA secretion in the intestinal mucosa.

[Key words] Shaoyaotang; 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid; ulcerative colitis; intestinal mucosal immune barrier; secretory immunoglobulin A

溃疡性结肠炎(UC)是一种常见的慢性炎症性肠病,临床以腹痛、腹泻、直肠出血等为主要临床表现,具有反复发作的特点^[1]。本病可严重影响患者的生活质量,造成身体和心理的双重折磨,且治疗导致的社会经济负担非常沉重^[2]。UC的病因及发病机制目前尚未完全阐明,肠道黏膜屏障功能降低被证明是溃疡性结肠炎发生的主要病理学基础^[3]。作为人体抵抗环境的重要防御线,肠黏膜屏障能够保护肠道细菌的稳态,减轻肠道炎症和免疫反应^[4]。免疫异常和感染引起的黏膜免疫屏障功能障碍是溃疡性结肠炎发病的重要因素^[5]。肠黏膜免疫屏障作为肠黏膜屏障的重要组成部分,在维持肠道免疫稳态和肠黏膜屏障保护中至关重要。因此从肠黏膜免疫屏障研究 UC 的发病机制和药物开发具有十分重要的意义^[6]。

西药治疗 UC 包括 5-氨基水杨酸,类固醇激素,免疫抑制剂和肿瘤坏死因子- α 等,虽有一定疗效,但其疗程长、复发高且不良反应明显^[7]。因此研究开发既能有效治疗 UC 且副反应小的药物成为当今 UC 药物开发的重要方向和热点,目前中医药治疗 UC 已成为一种重要的治疗手段,其治疗效果不断得到临床肯定^[8]。芍药汤出自《黄帝内经·素问·病机气宜保命集》,具有清脏腑热,清热燥湿,调气和血等功效,是临床治疗 UC 的代表方之一^[9]。既往有实验已证明芍药汤具有抑制炎症,调节肠道黏膜免疫等作用,对治疗 UC 具有很好的效果^[10-11],但芍药汤对肠黏膜免疫屏障的作用机制尚不明确。本实验拟建立 UC 模型,探讨芍药汤对 UC 大鼠肠黏膜免疫屏障的干预作用,为芍药汤调控 UC 肠黏膜免疫屏障的作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 150 ~ 170 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限

公司,合格证号 SCXK(湘)2016-0002,动物实验开展已取得湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准。

1.2 药物 芍药汤由白芍 30 g,黄芩 15 g,黄连 15 g,大黄 9 g,当归 15 g,槟榔 6 g,木香 6 g,肉桂 5 g,炙甘草 6 g 组成,饮片均购于湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房,由该院邓桂明副主任药师鉴定均为正品。先将药物浸泡 30 min,蒸馏水煎煮提取 2 次,过滤后合并提取液,于灭菌旋转蒸发仪中浓缩为生药质量浓度为 7.2 g·kg⁻¹ 的中药原液,冷却后置于 4 °C 冰箱保存备用。美沙拉嗪缓释颗粒剂购自上海爱的发制药有限公司,批号 H20143164,0.5 g/袋。

1.3 试剂 10% 水合氯醛(天津市凯信化学工业有限公司,批号 20170328);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C0105);2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国 Sigma 公司,批号 3LBD6811V);兔抗鼠 CD4⁺ 一抗,兔抗鼠 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(武汉博士德生物公司,批号分别为 BC025782, BM0621);兔抗鼠分泌型免疫球蛋白(Ig)A(SIgA)一抗(上海康朗生物公司,批号 KL8098);辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥生物公司,批号 ZB2306)。

1.4 仪器 RM2235 型精密轮转切片(德国 Leica 公司);KD-BM. BL 型组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);YD-AB 型组织摊烤片机(浙江益迪医疗设备有限公司);BA410E 型光学扫描显微镜(日本 Olympus 公司);WD-9405C 型电泳仪, DYCZ-24DN 型转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 造模 根据经典的 TNBS 法造模^[12]。造模前大鼠禁食 24 h,10% 水合氯醛 4 mL·kg⁻¹ 腹腔注射

麻醉大鼠,将石蜡油润滑过的 0.4 mm 直径聚乙烯软管插入直肠,深度约为 8 cm,缓慢注入 5% TNBS 50 mg·kg⁻¹及 50% 乙醇 0.25 mL,再将大鼠提尾倒置 60 s,使药液充分停留结直肠内,正常组予以等体积的生理盐水灌肠,清醒后自由饮水,造模组用 TNBS 灌肠造模 1 次后,连续 1 周从体质量变化、大便性状、便血情况、内脏敏感性、结肠病理等方面评价模型。造模 7 d 后随机抽取 2 只解剖,结肠病理显示充血、水肿、炎细胞浸润、隐窝脓肿、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化,提示造模成功^[13]。

2.2 分组及给药 采用随机数字表法将大鼠分为 6 组:正常组,模型组,美沙拉嗪组(0.067 g·kg⁻¹),芍药汤低、中、高剂量组(1.8,3.6,7.2 g·kg⁻¹),每组 10 只,雌雄各半;美沙拉嗪组和芍药汤低、中、高剂量组于造模 7 d 后开始灌胃给药,2 mL/次,1 次/d,持续灌胃 7 d;正常组和模型组同步 2 mL 生理盐水灌胃。各药均以蒸馏水作溶剂配置,以 60 kg 成人每日服用药物剂量与 160 g 大鼠体表面积换算比值换算出小鼠 1 d 用量,计算出各给药组的临床等效剂量^[14]。

2.3 标本采集 末次给药后禁食、禁水 24 h 后,10% 水合氯醛 4.0 mL·kg⁻¹腹腔注射麻醉大鼠,取血结束后处死大鼠,收集血液、结肠组织等进行指标检测,-20 ℃ 保存待测。

2.4 大鼠结肠一般形态学观察 自肛门处向上取结肠(8±2) cm 处,沿纵轴剪开,用生理盐水冲洗干净,参照 Luketal 标准^[15]进行结肠黏膜损伤程度评分:0 分,无炎症和溃疡;1 分,局部充血但无溃疡;2 分,充血而且肠壁变厚但没有溃疡;3 分,1 处溃疡及炎症,直径约 0~1 cm;4 分,2 处或 2 处以上溃疡及炎症,直径约 1.1~2 cm,但肠管与外周脏器无粘连;5 分,溃疡延伸超过 2 cm,肠管增厚,与周围脏器粘连严重,评估结肠黏膜大体形态损伤。

2.5 HE 染色观察大鼠结肠组织病理变化 用 4% 多聚甲醛固定结肠组织,经脱钙,脱水,透化,石蜡包埋,切片 4~5 μm 后,将切片用二甲苯脱蜡,无水乙醇水合,并用 HE 染色固定,在显微镜下观察组织学变化,并按组织学等级进行病理评分:0 分,肠黏膜和绒毛完整,结构完全正常;1 分,轻度黏膜下和/或固有层分离;2 分,中度黏膜下和/或固有层分离;黏膜下层和/或肌层水肿;3 分,严重黏膜下和/或固有层分离,黏膜下和/或肌层水肿,局部肠绒毛脱落;4 分,肠绒毛消失,肠坏死^[16]。

2.6 免疫组化法检测结肠组织中 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 表达 将约 1 cm³ 的大鼠结肠组织在 4% 多聚甲醛中固定 30~60 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次。将组织 50 ℃ 下脱水,包埋在石蜡中,并切成 4 μm 厚的切片置于载玻片。将所有样品脱蜡、水合、灭活、抗原修复处理。用 5% 牛血清白蛋白封闭切片 20 min,一抗 CD4⁺(1:500),SIgA(1:500) 37 ℃ 下温育 1 h,PBS 洗涤后,将切片与二抗羊抗兔 IgG(1:1 000)20~37 ℃ 温育 20 min,显色,经洗涤、脱水、透化、固定后,显微镜下观察。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 蛋白的表达 用预冷的裂解物处理结肠组织,并以 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min。提取总蛋白质(上清液)并进行凝胶电泳。通过半干法将蛋白质转移到膜上。用封闭液封闭膜 2 h,后与一抗 CD4⁺,SIgA,β-actin(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)温育 1 h,TBST 洗涤 4 次,用增强的化学发光试剂观察膜,使用凝胶成像系统获得图像,并用 Quantity One 软件读取灰度值。

2.8 统计分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对样本先进行正态性检验、方差齐性检验,方差齐时,用 One-Way ANOVA 检验,并进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和检验,用 Kruskal-Wallis Htest 比较总的差异及组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芍药汤对 UC 大鼠一般状况及结肠大体形态学的影响 正常组大鼠精神良好,毛发有光泽,活动、进食、大便正常,体质量自然增加。模型组大鼠表现精神沉郁,毛发无光泽,体质量下降,活动减少,并伴黏液便、血便等,各给药组一般状况较模型组明显好转。模型组大鼠结肠黏膜肉眼可见明显充血、水肿,以及不同程度的结肠黏膜糜烂,肠腔内可见多个小溃疡及伪膜出现。与正常组比较,模型组大鼠肠黏膜损伤程度评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组肠黏膜损伤程度评分明显下降($P < 0.05, P < 0.01$);与美沙拉嗪组比较,芍药汤中、高剂量组结肠黏膜损伤程度评分明显下降($P < 0.05, P < 0.01$);与芍药汤低剂量组比较,芍药汤中、高剂量组肠黏膜损伤程度评分明显下降($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 芍药汤对 UC 大鼠肠黏膜损伤程度评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

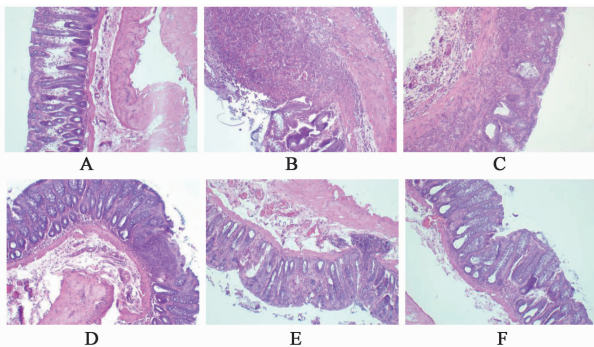
Table 1 Effect of Shaoyatong on score of intestinal mucosal injury in UC rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	损伤程度评分/分
正常	-	8	0.13 ± 0.13
模型	-	9	3.50 ± 0.33 ¹⁾
美沙拉嗪	0.067	10	2.70 ± 0.26 ²⁾
芍药汤	1.8	10	2.09 ± 0.21 ³⁾
	3.6	9	1.76 ± 0.12 ^{3,4,6)}
	7.2	9	1.34 ± 0.15 ^{3,5,6)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与美沙拉嗪组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$;与芍药汤低剂量组比较⁶⁾ $P < 0.05$,⁷⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 芍药汤对 UC 大鼠肠黏膜病理形态的影响

模型组肠黏膜明显充血、水肿,大量炎性细胞浸润,可见明显溃疡形成,溃疡周围的腺体缺损且分布杂乱,肠壁广泛纤维化,病变深达黏膜下层、肌层;各给药组大鼠肠黏膜及黏膜下层充血、水肿减轻,炎性细胞浸润减少且浸润层次变浅,肠黏膜溃疡呈愈合性改变,部分溃疡周围伴见新生腺体。与正常组比较,模型组病理学评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组肠黏膜病理学评分显著下降($P < 0.01$);与美沙拉嗪组比较,芍药汤中、高剂量组肠黏膜病理学评分显著下降($P < 0.01$);与芍药汤低剂量组比较,芍药汤中、高剂量组肠黏膜病理学评分明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1,表 2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 美沙拉嗪组;D. 芍药汤低剂量组;E. 芍药汤中剂量组;F. 芍药汤高剂量组(图 2~4 同)

图 1 芍药汤对结肠黏膜组织病理学的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effect of Shaoyatong on histopathology of colonic mucosa (HE, ×100)

3.3 芍药汤对肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 表达的影响 正常组肠黏膜 CD4⁺T 细胞,SIgA 在黏膜上皮、固有层及黏膜下层均有不同程度表达,CD4⁺T 细胞以黏膜下层分布为主,SIgA 以黏膜固有

表 2 芍药汤对 UC 大鼠肠黏膜病理学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Shaoyatong on pathological score of intestinal mucosa in UC rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	组织病理学评分/分
正常	-	8	0.13 ± 0.13
模型	-	9	19.75 ± 1.28 ¹⁾
美沙拉嗪	0.067	10	8.60 ± 0.62 ³⁾
芍药汤	1.8	10	6.45 ± 0.49 ³⁾
	3.6	9	5.12 ± 0.35 ^{3,5,6)}
	7.2	9	3.76 ± 0.46 ^{3,5,7)}

层及黏膜下层分布为主。与正常组比较,模型组大鼠肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 表达显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与美沙拉嗪组比较,芍药汤中、高剂量组肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与芍药汤低剂量组比较,芍药汤中、高剂量组肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞及 SIgA 表达明显升高($P < 0.05$)。见图 2,3,表 3。

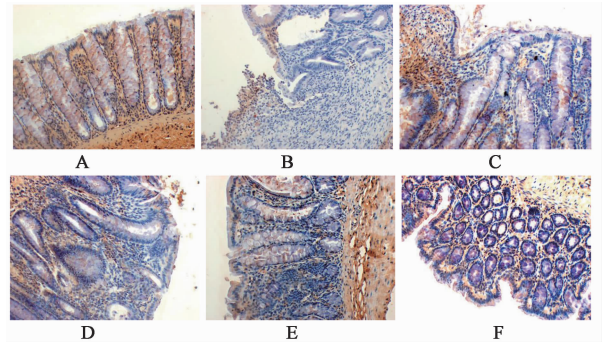


图 2 芍药汤对 UC 大鼠结肠 CD4⁺T 淋巴细胞表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.2 Effect of Shaoyatong on expression of colonic CD4⁺T lymphocytes in UC rats(IHC, ×200)

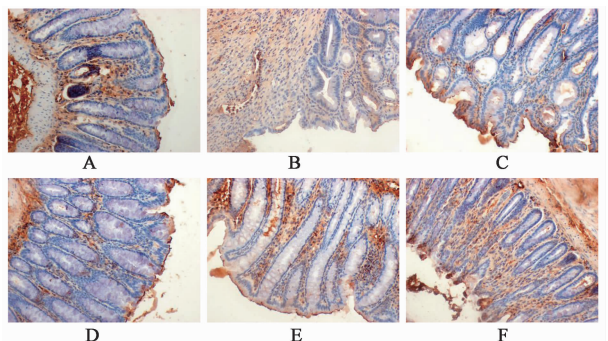


图 3 芍药汤对 UC 大鼠结肠 SIgA 表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.3 Effect of Shaoyatong on expression of SIgA in colon of UC rats(IHC, ×200)

表 3 芍药汤对 UC 大鼠肠黏膜 CD4⁺ T 淋巴细胞, SIgA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Shaoyatong on expressions of CD4⁺ T lymphocytes and SIgA in intestinal mucosa of UC rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	CD4 ⁺ T	SIgA
正常	-	8	28.50 ± 4.22	14.36 ± 1.30
模型	-	9	16.38 ± 2.68 ¹⁾	4.04 ± 0.70 ¹⁾
美沙拉嗪	0.067	10	20.12 ± 3.45 ^{1,2)}	7.48 ± 0.86 ³⁾
芍药汤	1.8	10	22.28 ± 3.78 ^{1,3)}	9.06 ± 1.12 ³⁾
	3.6	9	24.51 ± 4.12 ^{1,3,5,6)}	11.45 ± 1.45 ^{3,4,6)}
	7.2	9	26.19 ± 5.12 ^{1,3,5,6)}	12.26 ± 1.63 ^{3,5,6)}

3.4 芍药汤对肠黏膜 CD4⁺ T 淋巴细胞及 SIgA 蛋白相对表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肠黏膜 CD4⁺ T 淋巴细胞及 SIgA 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较,各给药组肠黏膜中 CD4⁺ T 淋巴细胞及 SIgA 表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与美沙拉嗪组比较,芍药汤中、高剂量组大鼠肠黏膜中 CD4⁺ T 淋巴细胞及 SIgA 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与芍药汤低剂量组比较,芍药汤中、高剂量组肠黏膜 CD4⁺ T 淋巴细胞及 SIgA 表达均有不同程度升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 4,表 4。

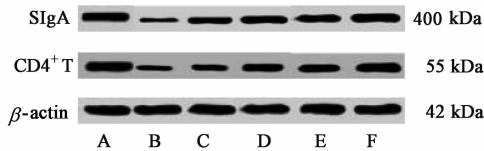


图 4 CD4⁺ T 淋巴细胞及 SIgA 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of CD4⁺ T and SIgA protein

表 4 芍药汤对肠黏膜 CD4⁺ T 淋巴细胞及 SIgA 蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Shaoyatong on expressions of CD4⁺ T lymphocytes and SIgA protein in intestinal mucosa($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	CD4 ⁺ T/ β -actin	SIgA/ β -actin
正常	-	8	1.12 ± 0.09	1.22 ± 0.08
模型	-	9	0.35 ± 0.03 ¹⁾	0.27 ± 0.05 ¹⁾
美沙拉嗪	0.067	10	0.68 ± 0.04 ^{1,2)}	0.74 ± 0.03 ³⁾
芍药汤	1.8	10	0.72 ± 0.05 ^{1,3)}	0.80 ± 0.04 ³⁾
	3.6	9	0.84 ± 0.04 ^{1,3,4,6)}	0.94 ± 0.05 ^{3,4,6)}
	7.2	9	1.04 ± 0.06 ^{1,3,4,7)}	1.15 ± 0.07 ^{3,4,6)}

4 讨论

近年来 UC 在我国的发病率呈逐年增加的趋势,已成为临床常见的难治性疾病。UC 的发病

机制主要与遗传、免疫、微生物等相关,免疫因素在其中占据了重要的地位^[17],其机制是肠黏膜的免疫系统发生异常导致肠道大量炎症细胞浸润,炎症因子大量释放引起肠上皮细胞坏死、脱落,引起肠黏膜屏障功能降低^[18]。SIgA 是肠道中重要的免疫调节蛋白,通过保护肠道生物屏障的完整调节免疫反应,起到维持肠黏膜稳态的第一道防线作用^[19]。在免疫反应过程中,结肠固有层(LP)T 淋巴细胞的活化和增殖对维持肠道免疫稳态极为重要,CD4⁺ T 细胞是其中最重要的一种,也是免疫调节的关键,它控制着免疫反应的强度,目前 CD4⁺ T 细胞已经被确定为 UC 的致病性 T 细胞,它是通过 Th1 或 Th2 引发肠道炎症^[20]。CD4⁺ T 细胞,SIgA 作为肠黏膜免疫屏障的重要组成部分,各种损伤、感染等因素均可影响肠黏膜 CD4⁺ T 细胞数量及 SIgA 含量,引起肠黏膜免疫屏障功能不同程度障碍^[21],因此 CD4⁺ T 细胞,SIgA 常被视为 UC 等疾病状态下肠黏膜屏障损伤的最直接反应。

UC 属中医“泄泻”“痢疾”范畴,湿热内蕴是其急性期的主要发病机制,用清热利湿法治疗具有不错的疗效,具有调气活血、清热利湿功效之芍药汤出自《黄帝内经·素问·病机气宜保命集》,为临床治疗该病的常用方剂^[10],方中以黄连、黄芩为君药,用其清热燥湿之功,入大肠除病因,并配以大黄,清中有泄,泄中有清,使湿热积滞从大便而去;重用白芍养血和营,缓急止痛,配伍当归养血活血,以达“行血则便脓自愈”之效;木香、槟榔行气导滞,“调气则后重自除”,四药相配,调和气血,是为臣药;加少量肉桂,一方面用其辛热温通之性遏制黄连、黄芩、大黄之苦寒,一方面助当归、白芍行血和营,为佐助兼反佐之药,甘草和中缓急,全方君臣佐使共配,达清、和、养、通之功^[1,22]。

本实验发现, TNBS 造模后,模型组肠黏膜损伤程度评分及病理学评分显著升高;给药后各组肠黏膜损伤程度评分及病理学评分较模型组显著下降,芍药汤中、高剂量组肠黏膜损伤程度评分和病理学评分较美沙拉嗪组和芍药汤低剂量组均显著下降,提示芍药汤低、中、高剂量与美沙拉嗪均能显著改善 UC 大鼠肠黏膜一般形态变化及病理损伤,其中芍药汤中、高剂量较芍药汤低剂量及美沙拉嗪作用更加明显;同时还发现 UC 模型大鼠肠黏膜中 CD4⁺ T 细胞数量及 SIgA 表达均低于正常组,给药后各组大鼠肠黏膜中 CD4⁺ T 细胞数量及 SIgA 表达均显著升高,芍药汤中、高剂量组大鼠肠黏膜中 CD4⁺ T 淋巴

细胞及 SIgA 蛋白表达升高最为显著,提示芍药汤可能通过增加肠黏膜中 CD4⁺T 细胞数量及 SIgA 分泌表达,减轻肠黏膜损伤,起到保护肠黏膜免疫屏障功能作用,其中芍药汤中、高剂量组作用最显著。

综上所述,芍药汤对 TNBS 诱导的 UC 大鼠有明显的治疗作用,能显著改善肠黏膜一般形态学及病理学变化,其作用机制可能与增加肠黏膜中 CD4⁺T 细胞数量及 SIgA 分泌表达,保护肠黏膜免疫屏障有关,这可能是其治疗 UC 的机制之一,为进一步深入探讨 UC 的作用机制以及芍药汤的药物开发提供了一定的理论依据和实验参考。

[参考文献]

[1] 王移飞,王凤仪,徐兰萍,等. 芍药汤经 HMGB₁ 调节湿热型溃疡性结肠炎大鼠 MyD88 和 NF- κ B 的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(12):86-91.

[2] 戴路明,朱磊,沈洪. 基于 β_2 AR/ β -arrestin2/NF- κ B 信号通路的清肠化湿颗粒防治溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(9):86-94.

[3] 周文鹏,白爱平. 炎症性肠病常见基因多态性[J]. 胃肠病学,2018,23(3):177-180.

[4] WANG K, WU L Y, DOU C Z, et al. Research advance in intestinal mucosal barrier and pathogenesis of crohn's disease [J]. Gastroenterol Res Pract, 2016, doi: 10.1155/2016/9686238.

[5] MA T M, XU N, MA X D, et al. Moxibustion regulates inflammatory mediators and colonic mucosal barrier in ulcerative colitis rats[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(8):2566-2575.

[6] Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier; a fundamental role in health and disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2017,11(9):821-834.

[7] YU X T, XU Y F, HUANG Y F, et al. Berberubine attenuates mucosal lesions and inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice[J]. PLoS One, 2018, doi:10.1371/journal.pone.0194069.

[8] 罗丹,仝战旗. 中医药治疗溃疡性结肠炎的临床研究进展[J]. 医学综述,2017,23(2):336-339,343.

[9] 齐雪阳,张勤生,张春燕. 芍药汤加减保留灌肠联合美沙拉嗪肠溶片治疗大肠湿热证溃疡性结肠炎[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(19):149-153.

[10] 夏修文,陈桥桥,丁斗,等. 芍药汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究进展[J]. 成都中医药大学学报,2018,41(3):119-123.

[11] 李冀,连建伟. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版

社,2016:89-90.

[12] LU Y, LIN H, ZHANG J, et al. Sijunzi Decoction attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats and ameliorates TNBS-induced claudin-2 damage via NF- κ B pathway in Caco2 cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):35.

[13] 赵欣,恽海峰,向桂玲,等. 白头翁汤加减联合双歧杆菌制剂对大鼠溃疡性结肠炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13):110-116.

[14] 贺石林,王键,王净净. 中国科研设计与统计学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2013:48.

[15] XU B, LIU X L, DONG W W, et al. EGCG maintains Th1/Th2 balance and mitigates ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium through TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in rats [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2017, doi:10.1155/2017/3057268.

[16] HOU Y, LU X, ZHANG Y. IRAK inhibitor protects the intestinal tract of necrotizing enterocolitis by inhibiting the Toll-like receptor (TLR) inflammatory signaling pathway in rats [J]. Med Sci Monit, 2018, 24:3366-3373.

[17] 孙健,高文艳,林一帆. 溃疡性结肠炎病因和发病机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(4):94-97.

[18] Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease[J]. World J Surg, 1998, 22(4):382-389.

[19] YU W, LU B, ZHANG H, et al. Effects of the Sijunzi decoction on the immunological function in rats with dextran sulfate-induced ulcerative colitis [J]. Biomed Rep, 2016,5(1):83-86.

[20] SANG L X, CHANG B, ZHU J F, et al. Sodium selenite ameliorates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice by decreasing Th1, Th17, and $\gamma\delta$ T and increasing CD4 (+) CD25 (+) regulatory T-cell responses[J]. World J Gastroenterol, 2017,23(21):3850-3863.

[21] CUI Y, ZHU C, MING Z, et al. Molecular mechanisms by which casein glycomacropeptide maintains internal homeostasis in mice with experimental ulcerative colitis [J]. PLoS One, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0181075.

[22] 王移飞,赵党生,王凤仪,等. 芍药汤调节湿热型溃疡性结肠炎大鼠 JAK2/STAT3 和 SOC3 的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(23):97-102.

[责任编辑 孙丛丛]