

黄蜀葵花乌梅复方提取物对 TNBS 诱导克罗恩病小鼠的治疗作用及其机制研究

王 琼¹ 周锦勇¹ 曲丁好² 周正璇² 杨柏霖¹ 陈玉根¹

(1.南京中医药大学附属医院,江苏南京 210029; 2.南京中医药大学第一临床医学院,江苏南京 210029)

摘要 目的:探讨黄蜀葵花乌梅复方提取物对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的克罗恩病(CD)实验小鼠的治疗作用及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ (IFN- γ)等炎症因子的影响。方法:BABL/c 小鼠随机分为正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶组和黄蜀葵花乌梅复方组,后 3 组应用 TNBS 诱导建立小鼠 CD 模型。造模开始时,柳氮磺吡啶组和黄蜀葵花乌梅复方组分别给予 0.5g/kg 柳氮磺吡啶和 6g/kg 黄蜀葵花乌梅复方提取物灌胃,每日 1 次,连续 28d。实验终点时分析实验动物的存活率、结肠长度/重量比值、结肠组织病理,以及结肠组织中炎症因子 TNF- α 和 IFN- γ 含量。结果:与模型组相比,黄蜀葵花乌梅复方组小鼠存活率明显增高,结肠重量/长度比值明显降低,结肠组织炎症和隐窝损害明显减轻,结肠病理评分和结肠组织 TNF- α 、IFN- γ 含量明显降低。结论:黄蜀葵花和乌梅复方提取物可用于 CD 的治疗,其作用机制可能与显著降低炎症因子 TNF- α 和 IFN- γ 含量有关。

关键词 克罗恩病 黄蜀葵花乌梅复方提取物 结肠 病理学 炎症因子 存活率 小鼠
中图分类号 R570.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2015)03-0080-03

克罗恩病是消化道慢性炎症性疾病,大多数患者反复发作,迁延不愈,预后不良。目前认为 CD 病因与遗传、免疫、感染等因素相关,主要治疗目标是诱导与维持缓解,或最终达到病变黏膜愈合^[1]。根据国内外治疗指南,活动期的 CD 治疗提倡渐进方案^[2],即轻度活动期采用 5-氨基水杨酸(5-ASA)制剂,中重度患者使用糖皮质激素,而激素无效者采用抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α)治疗,最后选择手术治疗。诱导缓解后的治疗包括戒烟、氨基水杨酸盐、激素及免疫抑制剂或生物制剂来维持治疗控制症状性复发。然而 5-ASA 或柳氮磺吡啶在病情缓解后维持治疗效果差,长期应用激素或采用免疫抑制剂或生物制剂有潜在不良反应,开发低毒有效治疗 CD 的药物具有重要意义。我们在临床中发现,CD 作为“内疡”,运用治疗慢性肾病和疮疡疗效确切的黄蜀葵花以及运用乌梅丸煎剂治疗均有明显疗效^[3-5]。因此,本研究以黄蜀葵花和乌梅中药饮片为原料制成黄蜀葵花乌梅复方提取物,采用三硝基苯磺酸(TNBS)制作 CD 模型小鼠,观察药物对 CD 小鼠的治疗作用以及对炎症因子的干预效果。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 黄蜀葵花乌梅复方提取物(黄蜀

葵花:乌梅=5:3)由江苏省中医院制剂部提供,黄蜀葵花和乌梅药材经江苏省中医院朱育凤主任鉴定合格。Picylsulfonic acid solution (TNBS),sigma,批号:SLBD6811V;无水乙醇,上海实意化学试剂有限公司,批号:2010030102;小鼠 TNF- α Elisa 试剂盒,美国 R&D 公司,批号:20140321XE;小鼠 IFN- γ Elisa 试剂盒,美国 R&D 公司,批号:20140320SD;BCA 蛋白测定试剂盒,Thermo,23227。

1.2 实验动物 BABL/c 小鼠 80 只,18~22g,雌雄各半,由扬州大学比较医学中心提供,动物合格证号:SCXK(苏)2012-0004。

2 实验方法

2.1 分组与造模 小鼠随机分为正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶组和黄蜀葵花乌梅复方提取物组(简称复方提取物组),每组 20 只。正常对照组不造模,正常饲养。模型组、柳氮磺吡啶组和复方提取物组小鼠剃毛,于皮肤外涂 TNBS 3.75mg(用 48%乙醇溶解),分别于外涂 TNBS 后的第 7、14、21 天直肠给予 TNBS 0.75mg、1.5mg、2.25mg(用 40%乙醇溶解),诱导 CD 小鼠模型^[6]。

2.2 药物干预 黄蜀葵花乌梅复方提取物临床人用剂量为 0.4g/kg,换算成小鼠用量为 6g/kg。柳氮

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目;南京市科技发展指导性计划南京药学会—常州四药项目(2013YX008)

磺吡啶临床人用剂量为 0.033g/kg, 换算成小鼠用量为 0.5g/kg。药物干预与造模同时进行。复方提取物组给予 6g/kg 黄蜀葵花乌梅复方提取物, 柳氮磺吡啶组给予 0.5g/kg 柳氮磺吡啶, 正常对照组和模型组给予等量生理盐水, 每日 1 次, 连续灌胃给药 28d。

2.3 观察项目 每日记录小鼠体重和死亡情况。实验结束时处死小鼠, 取血。取结直肠称重, 测量长度和厚度。在距肛门 5cm、10cm 和 15cm 处分别取结直肠组织进行结肠炎症病理评分和组织炎症细胞因子含量检测。10%福尔马林固定, 常规取材, 脱水, 石蜡包埋, 切片经苏木精-伊红(HE)染色, 光学显微镜观察, 并根据文献[7]进行结肠炎症病理评分。将小鼠结肠组织制成 10%组织匀浆, 参照试剂盒说明书, 检测细胞因子 TNF- α 和干扰素- γ (IFN- γ) 含量; 采用 BCA 试剂盒测定组织匀浆中蛋白含量, 结果以 pg/mg 表示。

2.4 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析, 计数资料用率(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, 样本统计分析采用组间 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠存活率比较 见表 1。与正常对照组比较, 模型组小鼠终点生存率明显降低($P < 0.001$)。与模型组比较, 复方提取物组小鼠终点生存率明显升高($P < 0.05$)。复方提取物组与柳氮磺吡啶组、柳氮磺吡啶组与模型组小鼠终点生存率比较, 无统计学差异。提示黄蜀葵花乌梅复方提取物能提高 TNBS 诱导的 CD 模型小鼠的存活率。

表 1 各组小鼠存活率比较

分组	动物数(只)	死亡数量(只)				终点生存率
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	
正常对照组	20	0	0	0	0	100%(20/20)
模型组	20	6	2	2	2	40.0%(8/20) ^{###}
柳氮磺吡啶组	20	6	2	0	0	60.0%(12/20)
复方提取物组	20	4	1	0	0	75.0%(15/20) [*]

注: 与正常对照组比较, $###\chi^2=17.143, P=0.000$; 与模型组比较, $*\chi^2=5.013, P=0.025$ 。

3.2 各组小鼠结肠长度/重量比值比较 见表 2。与正常对照组比较, 模型组小鼠结肠重量/长度比值明显升高($P < 0.001$)。与模型组比较, 柳氮磺吡啶组和复方提取物组小鼠结肠重量/长度比值明显降低($P < 0.05, P < 0.01$); 复方提取物组与柳氮磺吡啶组比较, 无统计学差异。提示黄蜀葵花乌梅复方提

取物能改善 TNBS 诱导的 CD 模型小鼠结肠炎症水肿。

表 2 各组小鼠结肠长度/重量比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	结肠重量/长度 (mg/cm)
正常对照组	-	8	31.63 \pm 0.82
模型组	-	8	41.26 \pm 4.10 ^{###}
柳氮磺吡啶组	0.5	8	36.07 \pm 3.49 [*]
复方提取物组	6	8	31.39 \pm 2.92 ^{**}

注: 与正常对照组比较, $###P < 0.001$; 与模型组比较, $*P < 0.05, **P < 0.01$ 。

3.3 各组小鼠结肠病变情况及病理评分比较 见图 1、表 3。如图 1 所示, 正常对照组(图 1-A)小鼠结肠未见明显病变; 模型组(图 1-B)小鼠结肠炎症严重程度为轻度或中度, 多数累及黏膜层和黏膜下层, 个别累及肌层, 多数见隐窝损害; 柳氮磺吡啶组(图 1-C)结肠炎症严重程度较模型组明显减轻, 病变均局限于黏膜层, 无隐窝损害; 复方提取物组(图 1-D)结肠炎症较模型组明显减轻, 炎症细胞类型同前, 病变均局限于黏膜层, 均无隐窝损害。病理评分结果表明, 与正常对照组比较, 模型组小鼠病理评分明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 柳氮磺吡啶与复方提取物组小鼠病理评分明显降低($P < 0.05$); 复方提取物组与柳氮磺吡啶组比较无统计学差异。提示黄蜀葵花乌梅复方提取物能显著改善 TNBS 对结肠的组织损害, 其改善作用与柳氮磺吡啶相当。

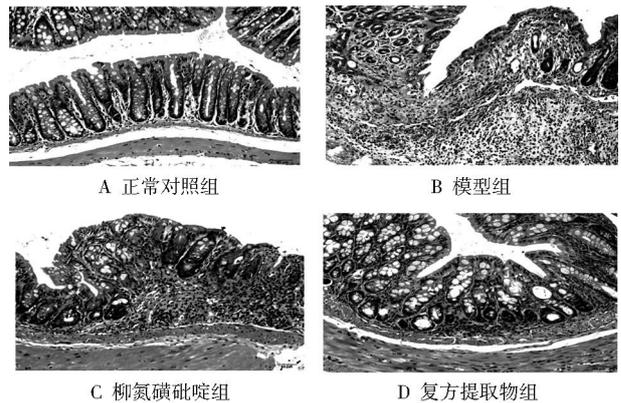


图 1 各组小鼠结肠病理图片(HE 染色, $\times 200$)

表 3 各组小鼠结肠病理评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	病理评分
正常对照组	-	8	0.67 \pm 0.36
模型组	-	8	9.88 \pm 2.63 [#]
柳氮磺吡啶组	0.5	8	3.63 \pm 0.42 [*]
复方提取物组	6	8	2.00 \pm 0.41 [*]

注: 与正常对照组比较, $\#P < 0.05$; 与模型组比较, $*P < 0.05$ 。

3.4 各组小鼠结肠组织中细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 含量比较 见表 4。与正常对照组比较,模型组小鼠结肠组织中 TNF- α 和 IFN- γ 含量明显升高 ($P<0.001$);与模型组比较,柳氮磺吡啶组和复方提取物组 TNF- α 和 IFN- γ 含量明显降低($P<0.01$ 、 $P<0.001$);复方提取物组与柳氮磺吡啶组比较无统计学差异。提示黄蜀葵花乌梅复方提取物能降低 TNBS 诱导的 CD 模型小鼠结肠组织炎症。

表 4 各组小鼠结肠组织中细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 含量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	TNF- α (pg/mg)	IFN- γ (pg/mg)
正常对照组	-	8	190.2 \pm 29.4	263.7 \pm 80.4
模型组	-	8	328.2 \pm 69.2 ^{###}	549.6 \pm 149.0 ^{###}
柳氮磺吡啶组	0.5	8	210.8 \pm 38.3 ^{**}	325.7 \pm 97.8 ^{**}
复方提取物组	6	8	151.1 \pm 22.0 ^{***}	150.2 \pm 25.8 ^{***}

注:与正常对照组比较,### $P<0.001$;与模型组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

4 讨论

江苏省中医院刘沈林教授认为,克罗恩病属于虚实互见、寒热错杂证候,治疗常采用寒热并用的代表方剂乌梅丸。CD 患者出现免疫功能紊乱,表现出以炎性浸润为特征的黏膜损伤及显著的纤维化,黄蜀葵花能调节免疫功能、抗肾间质纤维化,本院黄蜀葵花制剂疮灵液对克罗恩病肛瘘等低位单纯性肛瘘疗效确切^[8]。为此,我们在中医理论和临床实践指导下,开展黄蜀葵花和乌梅复方治疗炎症性肠病的研究。

TNBS 诱导的结肠炎动物模型为免疫介导的肠道炎症模型,引起以 Th1 为主的免疫应答,病变特点类似于克罗恩病^[9]。本研究结果表明,TNBS 诱导的慢性结肠炎模型较好地体现了 CD 从急性炎症向慢性炎症转化的动态过程,适用于 CD 中药复方物的药效学评价,而黄蜀葵花和乌梅组成的复方提取物能显著提高模型小鼠的存活率,降低结肠重量/长度比值,改善结肠病变程度,降低结肠病理评分,表明其对 CD 有较好的治疗作用。

细胞因子与炎症性肠病(IBD)发病密切相关,其中 TNF- α 和 IFN- γ 为重要的促炎症因子和免疫调节因子,阻断 TNF- α 和 IFN- γ 的产生、调控以及作用途径可以控制炎症和缓解病情。本研究结果表明,TNBS 诱导的模型小鼠结肠组织中 TNF- α 和 IFN- γ 含量升高,与正常对照组比较有统计学差异($P<0.001$),这与相关临床研究报道结果一致^[10-11]。黄蜀葵花乌梅复方提取物能显著降低模型组小鼠升高的 TNF- α 和 IFN- γ 含量,考虑这是其治疗 CD 可

能的机制之一。而 CD 的发病涉及细菌的识别与吞噬、内质网应激、上皮功能障碍、T 细胞分化、氧化应激和黏膜免疫防御等多个方面,考虑到中药的多靶点作用,进一步将从其他致病因素角度深入研究黄蜀葵花乌梅复方提取物治疗 CD 的作用机制。

参考文献

- [1] Sandborn WJ. Current directions in IBD therapy: what goals are feasible with biological modifiers? *Gastroenterology*, 2008, 135(5): 1442
 - [2] Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ, et al. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(2): 465
 - [3] 陈萍, 万毅刚, 王朝俊, 等. 黄蜀葵花制剂治疗慢性肾脏病的机制和疗效. *中国中药杂志*, 2012, 37(15): 2252
 - [4] 刘亮. 乌梅丸煎剂治疗克罗恩病 42 例的体会. *现代中医药*, 2011, 31(1): 19
 - [5] 刘沈林. 乌梅丸法治疗慢性难治性肠病临证心悟. *江苏中医药*, 2009, 41(7): 35
 - [6] Kremer B, Mariman R, Van Erk M, et al. Temporal colonic gene expression profiling in the recurrent colitis model identifies early and chronic inflammatory processes. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50388
 - [7] Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114(3): 385
 - [8] 杨晓侠. 疮灵液用于低位单纯性肛瘘术后创面的临床研究. 南京: 南京中医药大学, 2013
 - [9] 张月凡, 李楠. 炎症性肠病的实验动物模型的研究进展. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2011, 20(7): 678
 - [10] Saiki T, Mitsuyama M, Toyonaga A, et al. Detection of pro- and anti-inflammatory cytokines in stools of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 1998, 33(6): 616
 - [11] Stallmach A, Giese T, Schmidt C, et al. Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis*, 2004, 19(4): 308
- 第一作者: 王琼(1982-), 女, 药学博士, 主管药师, 研究方向: 肠道炎症及炎症转化药物调控研究。
通讯作者: 陈玉根, 教授, 博士生导师。
chenyg666@126.com

收稿日期: 2014-10-09

编辑: 吴宁