

# 蚤休复方对 TNBS 诱导炎症性肠病小鼠的治疗作用及其机制研究

王 卯 陈玉根 杨柏霖 王 琼 周锦勇 吴 静

(南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

**摘要** 目的:探讨蚤休复方对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的炎症性肠病(IBD)实验小鼠的治疗作用及其机制。方法: BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶组和蚤休复方组,后3组应用 TNBS 诱导建立小鼠 IBD 模型。造模同时柳氮磺吡啶组、蚤休复方组分别给予 0.5g/kg 柳氮磺吡啶 10g/kg 蚤休复方提取物灌胃,每日 1 次,连续 28d。实验终点时分析小鼠存活率、疾病活动指数(DAI)、结肠重量/长度比值、结肠黏膜组织病理,以及采用 MILLIPLEX@MAP 的小鼠细胞因子/趋化因子磁珠试剂盒定量检测 32 种细胞因子和趋化因子。结果:与模型组比较,蚤休复方组小鼠存活率增高,结肠重量/长度比值降低,IBD 疾病活动指数和结肠病理评分明显降低( $P<0.05$ );在细胞因子的血清水平方面,蚤休复方组小鼠血清 CCR5 配体 MIP-1 $\alpha$  明显低于模型组( $P=0.045$ ),而 CXCR3 配体 CXCL9(MIG)、CXCL10(IP-10)和 IL-12 P70 显著高于模型组( $P=0.006$ , $P=0.027$ , $P=0.030$ )。结论:蚤休复方提取物对 TNBS 诱导的 IBD 具有较好的治疗作用,其作用机制可能与 IFN- $\gamma$  协同刺激巨噬细胞产生 CXCL9(MIG)、CXCL10(IP-10)等因子,进而影响 T 细胞活化、趋化,产生类 TLR4 激动剂作用相关。

**关键词** 炎症性肠病 蚤休复方 结肠 炎症因子 趋化因子 病理学 小鼠 实验研究

**中图分类号** R574.05 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2015)09-0080-04

炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 是一种病因尚不明确的慢性非特异性肠道炎症性病变,包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)。近年来,IBD 发病率呈上升趋势,大部分 IBD 患者需终身治疗,而临床主要治疗药物如糖皮质激素、氨基水杨酸、免疫抑制剂和抗肿瘤坏死因子抗体副作用较多,多数患者不能长期坚持治疗,导致疾病复发和进展<sup>[1-2]</sup>。因此,开发安全有效的 IBD 新药具有重要意义。国医大师徐景藩教授是学贯中西的临床大家,他充分了解炎症性肠病发病机制及病程,在辨证论治的基础上,对于病程较长,反复腹痛、腹泻、发热,反复出现肠梗阻等并发症,以及肠镜提示肠腔狭窄的病例每多选用蚤休、青蒿、鸭跖草、紫草、露蜂房、白芷、地锦草等药,取得了较好的疗效。本研究总结徐景藩教授治疗炎症性肠病经验方蚤休复方,利用三硝基苯磺酸(TNBS)诱导建立小鼠 IBD 模型,采用临床治疗 IBD 常规用药柳氮磺吡啶作为对照,研究蚤休复方对炎症性肠病的治疗作用及其作用机制。

## 1 实验材料

1.1 药物与试剂 蚤休复方提取物(蚤休:青蒿:鸭跖草:紫草:地锦草:露蜂房:白芷=2:3:6:3:3:2:2)由江

苏省中医院制剂部提供。将所有药材(15剂,约1600g)加入约10倍量水中浸润30min,分2次水煮提取。第1次煮沸后在微沸状态下煎煮60min,过滤得滤液;剩余药渣再次加入10倍量水微沸状态下煎煮40min,过滤得滤液;合并2次滤液,加热浓缩至体积约1500mL,得浓度为1g生药/mL的浓缩水提物,分装,4℃条件下保存待用。三硝基苯磺酸(Picrylsulfonic acid solution, TNBS), SIGMA 公司;柳氮磺吡啶,上海中西三维药业有限公司;便隐血(OB)试剂盒,珠海贝索生物技术有限公司;MILLI- PLEX@MAP 的小鼠细胞因子/趋化因子磁珠试剂盒,美国 Millipore 公司。

1.2 实验动物 BALB/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。

1.3 实验仪器 MAGPIX 多重磁珠酶免分析平台,美国 Millipore 公司。

## 2 实验方法

2.1 小鼠实验分组及模型建立 80 只小鼠随机分为 4 组( $n=20$ ):正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶组和蚤休复方组。正常对照组不造模,正常饲养。模型组、柳氮磺吡啶组、蚤休复方组小鼠参照文献[3]方

基金项目:江苏省中医药局科技项目(LZ11034)

法,于实验前剃毛,皮肤外涂 TNBS 3.75mg(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(40%乙醇溶解),诱导 IBD 小鼠模型。

2.2 药物干预 药物干预与造模同时进行。蚤休复方组给予 10g/kg 蚤休复方提取物灌胃,柳氮磺吡啶组给予 0.5g/kg 柳氮磺吡啶灌胃,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 观察指标 每日记录小鼠体重、粪便性状、便隐血,参考文献[4]方法,对小鼠进行疾病活动指数(DAI)评分,并记录死亡情况。实验结束时处死小鼠,取结直肠称重,测量长度和重量。取结直肠组织进行结肠炎症病理评分,随后 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,参考文献评判标准进行结肠炎症组织病理学评分<sup>[5]</sup>。小鼠取血,利用多水平自动化和高通量的磁珠法筛选,即以 MILLIPLEX® MAP 的小鼠细胞因子/趋化因子磁珠试剂盒定量检测 32 种细胞因子和趋化因子。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 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 正常对照组小鼠实验过程中未出现死亡,存活率为 100%;模型组小鼠终点生存率为 70%,与正常对照组比较具有统计学差异( $P=0.02683$ );柳氮磺吡啶组及蚤休复方组小鼠终点生存率均较模型组高,但差异均无统计学意义。见表 1。

表 1 各组小鼠存活率比较

组别	起点动物数(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	0	2	2	2	70%(14/20)*
柳氮磺吡啶组	20	0	0	1	0	95%(19/20)
蚤休复方组	20	0	2	2	0	80%(16/20)

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ 。

3.2 各组小鼠结肠重量/长度比值比较 TNBS 诱导的 IBD 模型小鼠结肠重量/长度的比值升高,与正常对照组比较有显著性差异( $P<0.01$ );柳氮磺吡啶能显著降低 IBD 模型小鼠升高的结肠重量/长度比值( $P<0.01$ );蚤休复方组结肠重量/长度比值较模型组降低,但差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组小鼠结肠重量/长度比值比较

组别	动物数(只)	结肠重量/长度比值(mg/cm)
正常对照组	8	28.53±2.74
模型组	8	34.46±5.68**
柳氮磺吡啶组	8	28.41±2.74###
蚤休复方组	8	30.94±4.33

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

3.3 各组小鼠疾病活动指数比较 TNBS 诱导的 IBD 模型小鼠 DAI 指数较正常对照组明显升高( $P<0.01$ );柳氮磺吡啶和蚤休复方组小鼠 DAI 指数显著低于模型组( $P<0.01, P<0.05$ )。见表 3。

表 3 各组小鼠疾病活动指数比较

组别	动物数(只)	疾病活动指数
正常对照组	20	0
模型组	20	1.33±1.08**
柳氮磺吡啶组	20	0.48±0.61###
蚤休复方组	20	0.63±0.66#

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

3.4 各组小鼠结肠病变情况及病理评分比较 如图 1 所示,正常对照组小鼠结肠未见明显病变;模型组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;蚤休复方组结肠炎症较模型组减轻,炎细胞类型同前,病变均局限于黏膜层,均无隐窝损害。病理评分结果见表 4。与正常对照组比较,模型组小鼠病理评分明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,柳氮磺吡啶组和蚤休复方组小鼠病理评分均明显降低( $P<0.01, P<0.05$ )。

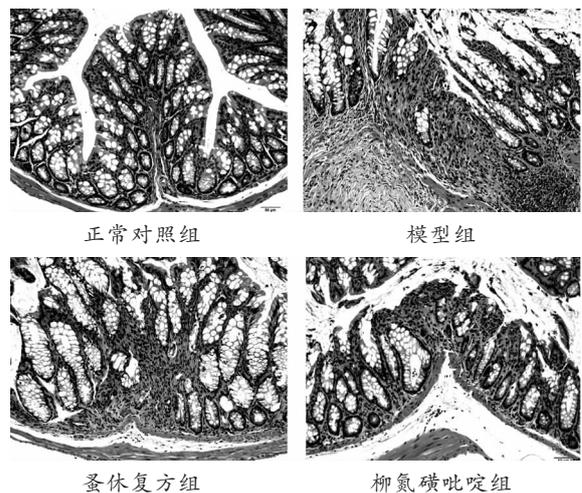


图 1 各组小鼠结肠病理图片(HE 染色,×200)

表 4 各组小鼠病理评分比较

组别	动物数(只)	病理评分
正常对照组	8	0
模型组	8	6.52±6.21**
柳氮磺吡啶组	8	0.18±0.32###
蚤休复方组	8	1.00±1.81#

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

3.5 各组小鼠细胞因子血清水平比较 检测了 32 种细胞因子和趋化因子,与模型组比较,蚤休复方组小鼠血清 IL-12 P70 明显增加 ( $P=0.030$ ),CCR5 配体 MIP-1 $\alpha$  明显减少( $P=0.045$ ),而 CXCR3 配体

CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP-10) 血清水平显著增加 ( $P=0.006, P=0.027$ )。

表5 各组小鼠 IL-12 P70、IP-10、MIP-1 $\alpha$  及 MIG 表达水平比较

组别	动物数(只)	IL-12 P70	IP-10	MIP-1 $\alpha$	MIG
正常对照组	8	7.64	188.05	35.40	68.87
模型组	8	6.56	154.75	51.27	32.97
柳氮磺吡啶组	8	12.47	174.62	38.18	66.13
蚤休复方组	8	20.37 <sup>#</sup>	239.68 <sup>#</sup>	28.79 <sup>#</sup>	154.74 <sup>##</sup>

注:与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

## 4 讨论

目前炎症性肠病的发病原因及机制尚不明确,一般认为可能与免疫、感染、环境、遗传等多种因素相关。西医治疗 IBD 以控制炎症、缓解症状为主,多采用氨基水杨酸类药物,如柳氮磺吡啶,主要有效成分为 5-氨基水杨酸,与肠壁结缔组织络合后较长时间停留在肠壁组织中起到抗菌消炎和免疫抑制作用,同时抑制前列腺素的合成以及其他炎症介质白三烯的合成。此法有一定疗效,但不良反应较大,复发率高。

徐景藩教授认为,炎症性肠病的主要病因病机为“热毒”。湿热蕴结肠腑,久而化火酿毒,阻滞气血,不通则痛;热毒壅盛,肉腐成脓,内溃成疡;入营动血,迫血妄行,下痢脓血。在辨证论治的基础上,徐老多选用蚤休、鸭跖草、紫草清热凉血解毒,青蒿、地锦草清热利湿,露蜂房攻毒止痛,白芷燥湿排脓,诸药共奏清热解毒、利湿敛疡之效。

TNBS 诱导以免疫介导的肠道炎症模型,引起的免疫应答以 Th1 为主,病变特点与炎症性肠病类似<sup>[6]</sup>。本研究采用 TNBS 诱导小鼠 IBD 模型,动物存活率 70%,可满足研究需要。模型小鼠结肠重量/长度的比值、疾病活动指数以及病理评分均升高,与正常对照组比较有显著性差异 ( $P<0.01$ ),表明 TNBS 诱导的 IBD 模型较好地体现了 IBD 从急性炎症向慢性炎症转化的动态过程,适用于 IBD 中药复方的药效学评价。与模型组相比,蚤休复方组小鼠存活率增高,IBD 疾病活动指数明显降低,结肠重量/长度比值降低,结肠病理评分明显降低,小鼠结肠炎症水肿改善,结肠组织炎症和隐窝损害明显减轻降低。上述结果共同提示蚤休复方提取物能减轻 TNBS 诱导的小鼠炎症性肠病症状,具有较好的治疗作用。

免疫因素,尤其是肠道免疫系统的调节异常,是 IBD 非常重要的发病原因及机制之一,细胞因子在机体免疫应答中具有重要作用。本研究检测了小鼠多种主要细胞因子含量的变化,结果发现与模型组相比,蚤休复方组小鼠 CCR5 配体 MIP-1 $\alpha$  明显减少 ( $P=0.045$ ),而 CXCR3 配体 CXCL9 (MIG)、

CXCL10 (IP-10) 的血清水平显著增加 ( $P=0.006, P=0.027$ )。有研究表明,MIP-1 $\alpha$  增加会加重 BALB/c 实验小鼠的结肠炎,其会显著增加小鼠发生穿透性溃疡的风险<sup>[7]</sup>。Toll 样受体 (TLR) 与炎症性肠病密切相关,特别是 TLR3 和 TLR4。TLR 一旦识别并结合 PAMP (病原相关分子模式,如 LPS) 就会导致下游信号事件和转录因子的协调激活,从而诱导抗微生物、化学趋化因子、细胞因子和共刺激因子的表达。TLR4 与干扰素协同,调节趋化因子的生成,如 MIG<sup>[8]</sup>。通过与其受体 CXCR3 结合,MIG 吸引 CD4+ 和 CD8+T 细胞,并激发宿主的炎症反应。有研究提出,激活 TLR 通路可缓解炎症性肠病小鼠肠道炎症<sup>[9]</sup>。亦有研究发现,静脉应用 TLR 配体既可呈现促炎作用,也可呈现抗炎作用,这取决于何种配体处于优势水平<sup>[10]</sup>。TLR4 激动剂可刺激大量产生 IP-10。IP-10 是不同细胞对 IFN- $\gamma$ 、微生物成分应答后产生的 CXC 化学激活因子,可对单核细胞、NK 细胞产生化学吸附作用,更重要的是 Th1 型细胞优先表达 IP-10 受体 CXCR3<sup>[11]</sup>。TLR4 的活化促进炎症前介质的释放,有助于白细胞的迁移浸润,激活天然免疫和获得性免疫系统,增强组织纤维化<sup>[12]</sup>。本项研究结果提示,蚤休复方中单体成分可能与 IFN- $\gamma$  协同刺激巨噬细胞产生 CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP-10) 等因子,进而影响 T 细胞活化、趋化,具有类 TLR4 激动剂作用。蚤休复方调节免疫应答的具体分子机制及活性单体成分有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 王玉芳,欧阳钦,胡仁伟,等.炎症性肠病流行病学研究进展.胃肠病学,2013,18(1):48
- [2] 胡仁伟,欧阳钦,陈曦,等.近 15 年我国炎症性肠病文献分析.胃肠病学,2007,12(2):74
- [3] 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
- [4] Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, et al. Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. Gastroenterology, 2002, 122: 1428
- [5] Dieleman LA, Palmen 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
- [6] 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
- [7] Pender SL1, Chance V, Whiting CV, et al. Systemic administration of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  exacerbates inflammatory bowel disease in a mouse model. Gut, 2005, 54(8):1114

# 中药保留灌肠方法治疗慢性盆腔炎的护理概况

宋爱英

(江苏省中医院, 江苏南京 210029)

**摘要** 中药保留灌肠是治疗慢性盆腔炎的一大特色,灌肠方法主要包含:灌肠器、灌肠润滑剂、灌肠温度、灌肠速度、灌肠液量、灌肠管深度、灌肠体位、灌肠保留时间等,目前灌肠方法治疗慢性盆腔炎已取得了较为显著的临床疗效,且具有副作用小、操作简便等优点。但由于中药治疗缺乏规范化的管理及循证医学的支持,仍需进一步加以改进,以期取得更加可观的效果。

**关键词** 盆腔炎 直肠给药 护理 综述

**中图分类号** R711.33 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2015)09-0083-03

盆腔炎性疾病 (Pelvic inflammatory disease, PID)是指女性上生殖道的一组感染性疾病,主要以输卵管炎、输卵管卵巢炎最常见。若此病未得到及时正确的诊治,可能会继发盆腔炎性疾病后遗症 (sequelae of PID),既往称慢性盆腔炎,极易迁延不愈,导致慢性盆腔痛,甚至不孕以及异位妊娠等。

中药保留灌肠是治疗该病的一大特色,主要因为:子宫与直肠相毗邻,直肠给药不经过上消化道,可避免胃酸和酶对药物的影响,也避免了对胃肠的刺激;同时还避免了药物的肝肾首过效应,减低了对肝肾的损伤;此外直肠黏膜下组织较为疏松,直肠给药,能使药液直达病灶,有利于药物直接吸收,增加盆腔局部药液浓度,减少炎症渗出,抑制结缔组织增生,促进血液循环,改善组织营养。有研究发现中药灌肠结合西医治疗盆腔炎,总体有效率明显提高,盆腔包块显著缩小,妇检阳性体征亦得到改善<sup>[1]</sup>。

临床治疗盆腔炎多选用清热活血,散瘀消癥之剂,因中医妇科治疗慢性盆腔炎,多考虑为湿热蕴结,瘀血内阻,壅塞胞宫,不通而痛,故采用红藤、败酱草清热解毒,丹参、赤芍活血散瘀,三棱、莪术散结消瘀,川楝子、延胡索理气止痛,穿山甲、路路通引经入络,直达病所。

传统灌肠多采用玻璃灌肠器或者注射器灌注药液,连接肛门管对患者进行药液灌注,灌肠前使用无菌棉签蘸取石蜡润滑肛管前段 15~20cm,排尽空气后插入直肠 15~20cm。此法无法控制药物的灌注速度,疗效不甚显著。另外,传统肛管灌肠,对肛门刺激较大,会导致患者不适甚至疼痛。现将中药灌肠方法治疗慢性盆腔炎的护理概况综述如下。

## 1 灌肠器

临床多采用改良后灌肠器进行操作,常见的有输液袋、输血袋甚至专用灌肠器等,可调节滴速,控制药物灌注速度,此外,还将肛门管换成一次性导

- [8] Powell JD, Boodoo S, Horton MR. Identification of the molecular mechanism by which TLR ligation and IFN- $\gamma$  synergize to induce MIG. *Clin Dev Immunol*, 2004, 11(1): 77
- [9] Vijay-Kumar M, Wu H, Aitken J, et al. Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13(7): 856
- [10] McDonnell M, Liang Y, Noronha A, et al. Systemic Toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(1): 298
- [11] Maria Eugenia Ariza, Rupal Ramakrishnan, Narendra P. Singh, et al. Bryostatin-1, a Naturally Occurring Antineo-

plastic Agent, Acts as a Toll-like Receptor 4 (TLR-4) Ligand and Induces Unique Cytokines and Chemokines in Dendritic Cells. *J Biol Chem*, 2011, 286(1): 24

- [12] Zhao H, Perez JS, Lu K, et al. Role of Toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(8): F801

第一作者:王卯(1987—),男,医学硕士,研究实习员,中西医结合肿瘤专业。

通讯作者:吴静,医学博士,主任医师,硕士研究生导师。wujingzh@yahoo.com

收稿日期:2015-05-26

编辑:吴宁