

丁氏溃结灌肠液对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎大鼠肠道屏障的保护作用

李睿瑛¹ 赵敏¹ 张亚杰² 谭妍妍² 丁康² 张苏闽²

(1.南京中医药大学,江苏南京 210023; 2.南京中医药大学第三附属医院,江苏南京 210001)

摘要 目的:研究丁氏溃结灌肠液对葡聚糖硫酸钠(Dextran Sulfate Sodium,DSS)诱导的溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis,UC)大鼠机械屏障、免疫屏障的影响,探讨其可能的作用机制。方法:50只SD大鼠采用DSS法建立急性期溃疡性结肠炎模型,造模成功后随机分为5组,分别为模型组、美沙拉秦灌肠液组和溃结灌肠液低、中、高剂量组,每组10只,另取10只大鼠作为空白对照组,分别给予相应药物或生理盐水灌肠14d。末次给药结束后,各组大鼠禁食不禁水24h,麻醉,取结肠标本观察肠黏膜变化情况,蛋白质印迹(Western Blot)法检测大鼠结肠组织紧密连接蛋白(occludin)含量,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清免疫球蛋白A(IgA)水平。结果:与空白对照组比较,模型组大鼠occludin含量、IgA水平显著降低($P<0.01$);经美沙拉秦灌肠液和丁氏溃结灌肠液治疗后,大鼠结肠组织occludin含量、IgA水平升高,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),尤以美沙拉秦灌肠液与溃结灌肠液高、中剂量组升高更为明显,而溃结灌肠液中、高剂量组与美沙拉秦灌肠液组治疗后上述指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:丁氏溃结灌肠液可以降低溃疡性结肠炎大鼠肠道通透性,对肠黏膜屏障有一定的保护作用,不同剂量的溃结灌肠液对肠黏膜屏障保护效果不同,中高剂量较低剂量组作用明显。

关键词 丁氏溃结灌肠液 溃疡性结肠炎 肠黏膜 病理学 紧密连接蛋白 免疫球蛋白A 实验研究
中图分类号 R574.620.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)11-0079-04

溃疡性结肠炎(UC)是一种主要累及结肠黏膜和黏膜下层的慢性肠道炎症性疾病,其病因和发病机制尚未明确^[1],可以引起肠黏膜屏障损伤,增加肠道通透性。目前,现代医学治疗本病主要是诱导缓解,无法从根本上治愈。大量研究表明,临床上许多疾病的发生、发展与转归都与肠道屏障损伤有关,完整的肠道屏障是防止肠道内有害物质和病原体的一道重要防线。当肠黏膜屏障损伤时,肠道中的微生物和内毒素等便可突破肠黏膜屏障,进入血液引起细菌、内毒素移位,促进肠原性感染的发生。机械屏障中的紧密连接蛋白(occludin)及免疫屏障中的免疫球蛋白A(IgA)在肠道损伤中发挥着重要作用。

丁氏溃结灌肠液具有清热化湿、护膜生肌、消肿止痛的功效,临床治疗溃疡性结肠炎疗效显著。其组成药物具有抗菌、调节免疫、抗氧化、解痉镇痛等药理学活性,可以减轻肠黏膜的炎性反应,帮助肠黏膜修复,促进溃疡愈合,消肿,抑制腹痛^[2]。本实验使用DSS法建立大鼠溃疡性结肠炎模型,探

讨丁氏溃结灌肠液对实验性UC模型大鼠机械屏障、免疫屏障功能的影响,为其临床应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康SD大鼠,60只,SPF级,体重180~220g,雌雄各半,浙江省实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(浙)2014-0001。

1.2 药物与试剂 DSS购自美国MP公司,批号:MP16011090;ELISA试剂盒购自Multisciences公司,批号:237450922;occludin蛋白抗体购自ABcom公司。灌肠方为南京市中医院院内制剂丁氏溃结灌肠液(处方包括:金银花120g、地榆120g、白及40g、复方珠黄散20g),苏药制字:Z040001781。美沙拉秦灌肠液由德国Falk公司生产,60g/4g,批号:H20100253。贝索BASO大便隐血(OB)试剂盒由南京市中医院检验科提供。

1.3 仪器与设备 荧光正置显微镜:OLYMPUS;全波长酶标仪:Bio-Tek Epoch;垂直电泳系统、转膜印记系统;全自动化学发光凝胶成像分析系统:BIO-

基金项目:江苏省自然科学基金(BK-20151082);江苏省中医药局科技项目(YB2015062);南京市中医院临床医学科学研究项目(YJLC201602)

Rad;电动组织匀浆器:德国 IKA T10;台式低温微量离心机:美国贝克曼 Microfuge22R。

2 实验方法

2.1 造模与分组 随机选取 10 只大鼠作为空白对照组,其余 50 只大鼠通过 DSS 法建立急性期溃疡性结肠炎的大鼠模型。将 DSS 用蒸馏水配制成 3.5% 的溶液,造模组大鼠自由饮用,现喝现配,连饮 7d,空白对照组大鼠饮用纯水。造模组大鼠出现腹泻、便血、体重下降等症状,说明模型复制成功。造模成功后,将 UC 模型大鼠随机分为 5 组,分别为模型组、美沙拉秦灌肠液组和溃结灌肠液低、中、高剂量组,每组 10 只。停饮 DSS,各组饮水恢复正常,开始灌肠给药。按非标准体重动物的校正系数表^[3],人与大鼠换算系数为 6.17,折算大鼠用量。溃结灌肠液低、中、高剂量组分别予丁氏溃结灌肠液 1.5g/kg、3g/kg、6g/kg 灌肠,美沙拉秦灌肠液组予美沙拉秦灌肠液 2.4g/kg 灌肠,灌肠量均 1mL/100g。模型组大鼠给予等剂量生理盐水灌肠,空白对照组自由喂养,不予灌肠处理。灌肠 3d 后,除空白对照组外,其余各组复饮 4%DSS 5d,同时继续灌肠治疗,5d 后停饮 DSS,恢复正常饮水,再继续灌肠治疗 6d,各组灌肠时间为 2 周。

2.2 大鼠一般情况观察 饲养过程中对大鼠进行一般情况观察,观察指标包括精神状态、活动情况、毛发光泽度、饮水量、大便情况(血便、腹泻、大便次数等)和体重改变等。

2.3 结肠黏膜病理及肠组织 Occludin 蛋白含量、血清 IgA 水平观察 末次给药结束后,大鼠禁食不禁水 24h。10%水合氯醛腹腔麻醉,剖腹暴露全结肠,腹主动脉取血,ELISA 法检测血清 IgA 水平。取出距肛门 2cm,长约 7~8cm 结肠,沿纵轴剪开,并用 PBS 液冲洗干净后,将结肠黏膜展平,肉眼观察肠黏膜的病变。然后立即用 4% 的多聚甲醛溶液固定,送南京市中医院病理科,石蜡包埋,每份蜡块制成厚度 5μm 的切片,HE 染色,用光学显微镜观察形态结构,Western-Blot 法检测结肠组织 Occludin 蛋白含量。

2.4 统计学方法 采用 SPSS20.0 统计软件,各组指标检测结果使用单因素方差分析,用($\bar{x} \pm s$)表示,检验总体均数差异性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般情况 空白对照组大鼠毛色光滑,精神活跃,反应灵敏,饮食正常,大便正常,呈球状或长条状,体重增加。各造模组大鼠在饮用 DSS 第 3 日出现大便稀,大便隐血阳性,部分大鼠出现肉眼血便、精神萎靡、体重较前下降。模型组大鼠使用生理盐水灌肠后大便一直稀伴有黏液血。不同剂量溃结灌肠液灌肠给药 5d 后,大便性状由稀便转为糊状便,精神状况好转,体重较前增加,以中、高剂量溃结灌肠液组改善更为明显。治疗第 12 天溃结灌肠液高剂量组有 2 只大鼠死亡,对死亡大鼠进行解剖,发现距肛门 5cm 处结肠黏膜穿孔,可能是操作过程中,大鼠挣扎,灌胃针戳破肠壁而致。美沙拉秦灌肠液组灌肠给药后,大便性状、便血情况逐渐恢复正常,精神状况好转,体重增加。

3.2 结肠黏膜大体观察 空白对照组大鼠结肠黏膜光滑平整,黏膜淡红,未见充血、水肿及糜烂溃疡。模型组大鼠结肠黏膜明显充血、水肿,溃疡形成,溃疡大小不一,主要位于黏膜层及黏膜下层。溃结灌肠液组大鼠结肠黏膜充血、水肿、轻度糜烂、无明显溃疡形成。美沙拉秦灌肠液组大鼠结肠黏膜无明显充血、水肿、糜烂及溃疡。

3.3 结肠黏膜病理观察 空白对照组大鼠结肠结构清晰,黏膜上皮细胞排列整齐,肠腺规则,杯状细胞丰富,固有层可见散在淋巴细胞。模型组大鼠结肠黏膜脱落坏死,形成不同程度溃疡灶,大量炎性细胞浸润,黏膜腺体破坏,排列稀疏紊乱,伴不同程度的扩张。溃结灌肠液组大鼠结肠黏膜无明显溃疡形成,黏膜水肿充血和炎性细胞浸润减少,中、高剂量组较低剂量组损伤更少。美沙拉秦灌肠液组大鼠结肠黏膜充血、水肿,炎性细胞浸润,腺体排列较整齐,无明显溃疡形成。见图 1。

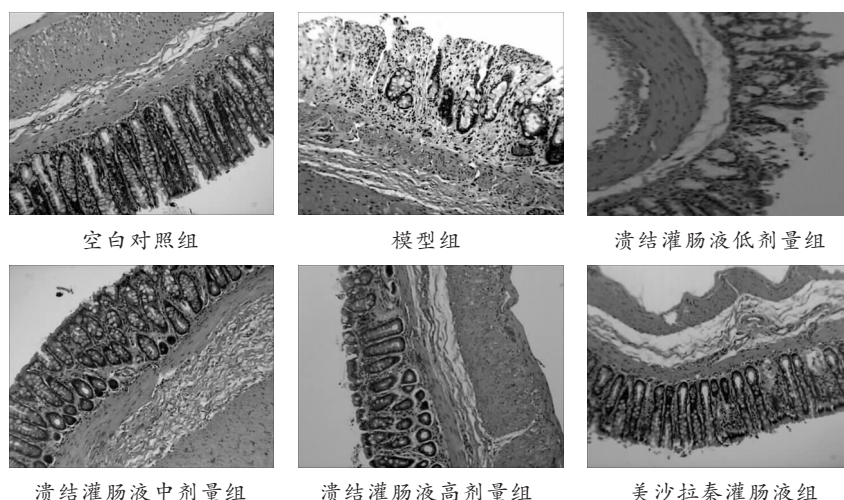


图 1 各组大鼠结肠黏膜病理表现($\times 200$)

3.4 各组大鼠血清中 IgA 水平比较 与空白对照组比较,模型组大鼠血清 IgA 水平明显下降($P<0.01$);与模型组比较,溃结灌肠液各剂量组和美沙拉秦灌肠液组大鼠血清 IgA 水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),说明丁氏溃结灌肠液可以增加大鼠血清 IgA 水平,对肠黏膜免疫屏障具有保护作用,且较低剂量即有作用。溃结灌肠液中、高剂量与美沙拉秦灌肠液对 UC 模型大鼠血清 IgA 的改善程度相当。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 IgA 含量($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	IgA($\mu\text{g/mL}$)
空白对照组	10	50.40 $\pm$ 18.47
模型组	10	20.69 $\pm$ 3.76 $\Delta\Delta$
溃结灌肠液低剂量组	10	31.44 $\pm$ 6.53 $^*\blacktriangle$
溃结灌肠液中剂量组	10	42.58 $\pm$ 8.16 **
溃结灌肠液高剂量组	8	43.26 $\pm$ 14.84 **
美沙拉秦灌肠液组	10	46.03 $\pm$ 18.88 **

注:与空白对照组比较 $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较, $^*P<0.05$,

$^{**}P<0.01$;与美沙拉秦灌肠液组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

3.5 各组大鼠结肠黏膜 occludin 蛋白含量比较 与空白对照组比较,模型组大鼠紧密连接蛋白 occludin 含量明显降低($P<0.05$)。丁氏溃结灌肠液和美沙拉秦灌肠液可以升高 UC 模型大鼠结肠黏膜 occludin 蛋白含量,美沙拉秦灌肠液和溃结灌肠液中、高剂量对 occludin 蛋白的增加作用较明显($P<0.05$)。溃结灌肠液中、高剂量组与美沙拉秦灌肠液组 occludin 蛋白含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2、表 2。

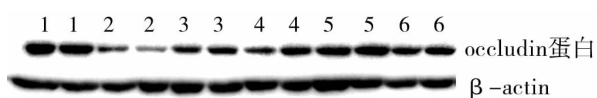


图 2 occludin 蛋白 Western Blot 结果

注:1.空白对照组;2.模型组;3.溃结灌肠液低剂量组;4.溃结灌肠液中剂量组;5.溃结灌肠液高剂量组;6.美沙拉秦灌肠液组。

表 2 各组大鼠结肠组织 occludin 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	occludin/β-actin
空白对照组	10	0.76 $\pm$ 0.02
模型组	10	0.24 $\pm$ 0.07 Δ
溃结灌肠液低剂量组	10	0.31 $\pm$ 0.12 $^*\blacktriangle$
溃结灌肠液中剂量组	10	0.54 $\pm$ 0.07 *
溃结灌肠液高剂量组	8	0.59 $\pm$ 0.14 *
美沙拉秦灌肠液组	10	0.62 $\pm$ 0.09 *

注:与空白对照组比较, $\Delta P<0.05$;与模型组比较, $^*P<0.05$;与美沙拉秦灌肠液组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

4 讨论

中医学没有关于 UC 病名的记载,根据其发病特点及临床症状,可以归属于“久痢”“肠癖”等范畴。UC 病位在大肠,与肝、脾、肾、肺等脏腑密切相

关,病机总属本虚标实,以脾虚失健为本,湿热留恋、肠络瘀阻为标,治疗以清热解毒、健脾燥湿、活血化瘀为大法。

目前,五氨基水杨酸(5-ASA)治疗炎症性肠病的机制尚未完全清楚,可能是通过抑制 NK 细胞活性,抑制抗体形成,干扰花生四烯酸代谢,抑制白三烯与前列腺素样物质合成,清除氧自由基和抑制脂肪酸过氧化等发挥抗炎作用,为治疗轻、中度 UC 的主要药物,也是维持缓解最有效的药物^[4]。5-ASA 灌肠剂适用于轻中度远侧 UC 患者,耐受性好,副作用小。以乙酰纤维素半透膜包裹的彼得斯安,在肠道缓慢分解、控制释放,药物成分大部进入结肠,发挥局部抗炎作用,极少有全身不良反应^[5]。

据报道,IgA 通过抑制 LPS 诱导细胞因子的生产如 TNF- α 和 IL-1 β 而发挥抗炎作用^[6]。IgA 免疫缺陷与炎症性肠病发生发展有一定的关系^[7]。IgA 是机体产生的最丰富的免疫球蛋白,可以阻止微生物在黏膜上皮层黏附、繁殖及侵入^[8],增加肠道的免疫屏障,从而起到减少炎症反应的目的。肠上皮紧密连接(Tight Junction,TJ)的破坏及其导致的肠黏膜屏障功能受损在 UC 发病中起着关键作用。Occludin 是 TJ 中最重要的结构蛋白,不仅能通过外环以拉链式结合进而产生严密的细胞旁封闭,还能与不同的分子结合,参与 TJ 形成的信号调节^[9-12]。有研究表明,缺乏 occludin 蛋白的成纤维细胞不能形成典型的 TJ 结构。细胞的 TJ 取决于紧密连接蛋白数量和分布,其对于屏障功能的维持和紧密连接的完整性具有重要作用^[13]。

本研究结果表明,与空白对照组比较,模型组大鼠结肠黏膜 occludin 蛋白、血清 IgA 水平明显下降,存在显著性差异;经丁氏溃结灌肠液、美沙拉秦灌肠液灌肠治疗后,UC 模型大鼠结肠 occludin 蛋白、血清 IgA 水平均有明显升高。occludin 蛋白、IgA 参与了 UC 的发病,提示本研究各治疗药物可能是通过增加结肠黏膜 occludin 蛋白、血清 IgA 水平从而促进受损黏膜的修复。丁氏溃结灌肠液在治疗 UC 的过程中,作用明显,过程复杂,因此我们下一步拟深入研究丁氏溃结灌肠液在机械屏障、免疫屏障、生物屏障及化学屏障等方面对 UC 的治疗机制。

参考文献

- [1] 曹杰.益生菌在炎症性肠病中的临床应用[J].中华胃肠外科杂志,2007,10(3):291.
- [2] 殷洁.溃结灌肠液与柳氮磺吡啶栓治疗溃疡性结肠炎的临床对比研究[D].南京:南京中医药大学,2012.
- [3] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069.

狼疮性肾炎的中医药诊疗进展

胡平新¹ 金思佳¹ 鲁盈²

(1.浙江中医药大学第二临床医学院,浙江杭州 310053; 2.浙江省立同德医院,浙江杭州 310012)

摘要 近年来,中医中药对治疗狼疮性肾炎(LN)研究颇多,成为临床治疗LN的有力武器。但目前,中医在LN的病名、病因病机、理法方药上尚未统一。对于LN,中医百家争鸣,既有单纯辨证论治,亦有分期施治,临床疗效可靠。在2008年西医推出多靶点药物治疗理念后,中医家亦提出中医药多靶点治疗思想。相比较西医,中医多靶点治疗疾病更具有多元化,且临床缓解率高,复发率低。基于传统中医理论和现代药理学,中医药多靶点联合治疗的机制逐渐成为LN控制病情和抗复发的重要手段之一,而这正是未来中医临床治疗LN的发展方向。

关键词 狼疮性肾炎 多靶点药物治疗 中医药疗法 综述

中图分类号 R259.932.42

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2016)11-0082-04

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种常见的全身性自身免疫性疾病,其主要由于自身抗原抗体相结合形成免疫复合物沉积于靶器官,从而导致多系统免疫性损害。SLE在我国人群中的患病率约为70/10万,以中青年女性为主。狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是系统性红斑狼疮的严重并发症之一,约50%以上SLE患者会出现肾脏受累表现,而发生肾病理损伤的概率几乎为100%。大约20%的LN患者可在5年之内进展为终末期肾病^[1]。因此,寻找行之有效的LN诊疗方案具

有重要临床意义。

狼疮性肾炎是一种复杂的免疫系统疾病,单用激素或免疫抑制剂治疗效果不佳,故LN的多靶点药物治疗(multi-target therapeutics, MT)应运而生。但临床大量应用激素及免疫抑制剂,毒副作用大,复发率高,长期治疗会产生较多并发症。中医以整体观念论治狼疮性肾炎,其在改善症状、缓解病情上有其独特的优势。但LN的病情复杂多变,病因病机及理法方药尚未统一。而基于中医基础理论及现代中药药理研究发现,中医药亦存在多靶点治疗,

- [4] 欧阳钦.溃疡性结肠炎的治疗[J].中国实用内科杂志,2010,30(4):383.
- [5] LARMONIER C B, MIDURA-KIELA M T, RAMALIN-GAM R, et al. Modulation of neutrophil motility by curcumin; implications for inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(2):503.
- [6] WOLF H M, FISCHER M B, PUHRINGER H, et al. Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-6) in human monocytes[J]. Blood, 1994, 83(5):1278.
- [7] BRANDTZAEG P, CARLSEN H S, HALSTENSEN T S. The B-cell system in inflammatory bowel disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2006, 579:149.
- [8] 蒋蔚茹.炎症性肠病的认识与治疗进展[J].上海医药, 2010, 31(5):207.
- [9] SCHWELBERGER H G, BODNER E. Identity of the diamine oxidase proteins in porcine kidney and intestine [J]. Inflamm Res, 1998, 47(Suppl 1):S58.
- [10] ARAKI Y, MUKAISYO K, SUGIHARA H, et al. Increased

apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. Oncol Rep, 2010, 24(4):869.

- [11] FERGUSON L R. Nutrigenomics and inflammatory bowel diseases[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2010, 6(4):573.
- [12] HAN X. Intestinal permeability as a clinical surrogate endpoint in the development of future Crohn's disease therapies [J]. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2010, 4(2):159.
- [13] 申金雁,殷国荣.肠黏膜免疫:刚地弓形虫感染中抗体分泌细胞及sIgA的地位[J].国际医学寄生虫病杂志, 2009, 36(3):129.

第一作者:李睿瑛(1989—),女,硕士研究生,中医外科肛肠病研究方向。

通讯作者:张苏闽,大专学历,主任医师,硕士研究生导师。chenmin740@hotmail.com

收稿日期:2016-06-12

编辑:吴宁