

理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织TNF- α mRNA表达的影响

邱明义, 范 恒, 梅家俊, 沈关心, 刘松林, 赵映前

邱明义, 梅家俊, 刘松林, 赵映前, 湖北中医学院 湖北武汉市 430061
范恒, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科
湖北武汉市 430022
沈关心, 华中科技大学同济医学院 湖北武汉市 430022
邱明义, 男, 1946-05-16 生, 湖北随州人, 汉族, 1970 年湖北中医学院本科毕业, 教授, 湖北中医学院博士生导师, 主要从事经方防治胃肠病的临床与基础研究。湖北省教委资助项目, No.99Z014
项目负责人: 邱明义, 430061, 湖北省武汉市, 湖北中医学院。
qiumingyi9256@163.com
电话: 027-68889256 传真: 027-68889082
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-30

Effect of Chinese herb compounds Lichangsifang on TNF- α mRNA expression of colon tissue in rats with ulcerative colitis

Ming-Yi Qiu, Heng Fan, Jia-Jun Mei, Guan-Xin Shen, Song-Lin Liu, Ying-Qian Zhao

Ming-Yi Qiu, Jia-Jun Mei, Song-Lin Liu, Ying-Qian Zhao, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Heng Fan, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Guan-Xin Shen, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by Hubei Provincial Department of Education, No. 99Z014
Correspondence to: Ming-Yi Qiu, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 1 Tanhualin, Wuchang 430061, Hubei Province, China.
qiumingyi9256@163.com
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-07-30

Abstract

AIM: To study the effect of Lichangsifang (LCSF) on TNF- α mRNA expression in rats with ulcerative colitis (UC).

METHODS: Ninety-eight SD rats were randomly divided into seven groups, and every group had fourteen rats (seven rats were male, and seven, female), namely the normal control group, the pathologic control group, sulfasalazine (SASP) group, Wumeiwan (WMW) group, Baitouwengtang (BTWT) group, Senglingbaishuan (SLSS) group and Tongxieyaofang (TXYF) group. Except the normal control group, the other six animal model groups of UC were made through the integration of general immunity and local stimulation with DNCB and acetic acid. The six animal model groups of UC were treated by SASP, TXYF, WMW, BTWT, SLBSS and TXYF respectively. After these treatment, the changes of some immune indexes in the colon tissue such as the level of TNF- α mRNA expression were evaluated by *in situ* hybridization.

RESULTS: The level of TNF- α mRNA expression in pathologic groups was significantly higher than that in normal

controls ($P < 0.01$, $t = 4.128$ vs normal control). The TNF- α mRNA expression was decreased in WMW than those in other pathologic groups ($P < 0.01$, $t = 3.435$ or $P < 0.05$, $t = 2.593$). TNF- α mRNA expression was decreased in WMW group than those in BTWT group, SLBSS group and TXYF group ($P < 0.05$, $q = 2.581$ vs BTWT group, $q = 2.834$ vs SLBSS group, $q = 2.624$ vs TXYF group). There was no remarkable difference in the level of TNF- α mRNA expression among BTWT group, SLBSS group and TXYF group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: This model induced with DNCB and acetic acid is successful. It is obvious that the cytokines play important roles in pathogenesis of UC, especially proinflammatory cytokines TNF- α , which can promote inflammation. WMW is the most effective among the compounds, which have curative effects by adjusting immunity and inhibiting abnormal inflammatory reaction in the course of UC.

Qiu MY, Fan H, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Zhao YQ. Effect of Chinese herb compounds Lichangsifang on TNF- α mRNA expression of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):706-710

摘要

目的: 观察理肠四方对溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠组织细胞因子 TNF- α mRNA 的表达的影响, 比较四方疗效大小, 并分析其作用机制。

方法: 应用 2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立 UC 大鼠模型, 将 98 只健康 SD 大鼠(雌雄各半), 按雌雄随机分 7 组, 分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组、模型组和正常组, 分别观察治疗后大鼠结肠黏膜 TNF- α mRNA 的表达变化, 并进行统计学比较。

结果: 造模后细胞因子 TNF- α mRNA 的表达升高(模型组与正常组平均吸光度比较 $P < 0.01$, $t = 4.128$ vs 正常组), 理肠四方各治疗组、SASP 组与模型组比较有显著意义($P < 0.01$, $q = 12.37$ vs 乌梅丸组, $q = 9.52$ vs 白头翁汤组, $q = 8.79$ vs 参苓白术散组, $q = 8.54$ vs 痛泻要方组, $q = 8.92$ vs SASP 组), 但除乌梅丸外, 理肠四方之间比较无明显差异。

结论: 经两两比较后, 乌梅丸疗效最好, 白头翁汤、参苓白术散、痛泻要方与 SASP 组疗效相当。表明理肠四方可下调促炎细胞因子 TNF- α , 从而使溃疡性结肠炎大鼠免疫功能恢复正常, 达到治疗的目的。

邱明义, 范恒, 梅家俊, 沈关心, 刘松林, 赵映前. 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 TNF- α mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):706-710
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/706.asp>

0 引言

细胞因子与溃疡性结肠炎(UC)关系密切, 其中 TNF- α 是公认的以单核巨噬细胞产生为主的、能介导 UC 发病的细胞因子^[1-5]. 有人已进一步证实: TNF- α mRNA 的表达在活动期高于非活动期 UC^[6]. 我们用 UC 大鼠结肠 TNF- α mRNA 表达为观察指标, 以进一步了解中药理肠四方对 UC 细胞因子的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 理肠四方的药物组成及剂量如下: 乌梅丸: 乌梅 16 g, 细辛 6 g, 干姜 10 g, 黄连 16 g, 当归 4 g, 附子 6 g, 蜀椒 4 g, 桂枝 6 g, 生晒参 6 g, 黄檗 6 g; 白头翁汤: 白头翁 30 g, 黄柏 24 g, 黄连 10 g, 秦皮 24 g; 参苓白术散: 莲子肉 10 g, 薏苡仁 10 g, 缩砂仁 10 g, 桔梗 10 g, 白扁豆 15 g, 白茯苓 20 g, 生晒参 20 g, 甘草 20 g, 白术 20 g, 山药 20 g; 痛泻要方: 炒白术 30 g, 白芍 20 g, 陈皮 15 g, 防风 20 g. 柳氮磺胺吡啶(SASP)批号 200111002, 由上海三维制药有限公司生产(250 mg/片). 乌梅丸: 将生药中含挥发油的药物(当归、细辛、木香等)放入提油器中, 加蒸馏液(含挥发油), 用乙醚溶解, 再蒸发乙醚, 得挥发油(2 mL). 再将以上药液(包括药渣)倒入药罐中, 将其他不含挥发油的药物亦加入此药罐, 开始用武火, 煮沸后用文火, 保持沸腾 30 min, 搅拌后趁热过滤. 其药渣再加蒸馏水蒸煮一次, 煮沸时间 20 min, 过滤, 合并滤液, 在电炉上浓缩成 515 g/L, 再将蒸馏的植物油加入此药液中, 消毒后分两瓶装, 压盖备用. 白头翁汤、参苓白术散、痛泻要方等三方药物的制备均按以上方法配制成含生药浓度分别为 562 g/L、987 g/L、216 g/L 的水煎剂. 柳氮磺胺吡啶药物制备: 将 88 片 SASP 用研钵研细, 用 100 目筛筛过, 然后再研, 直至最后剩下 1-2 g 残渣, 仍放进研粉中, 将研粉配成 26 g/L 混悬液. TNF- α 原位杂交检测试剂盒、原位杂交专用盖玻片、DBA 显色试剂盒、poly-L-lysine(多聚赖氨酸)、DEPC、200 mL/L 甘油等均由武汉博士德生物工程有限公司提供. 健康 SD 大鼠 98 只(雌雄各半, 体质量 300 \pm 50 g)由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供.

1.2 方法 将 SD 健康大鼠 98 只(雌雄各半), 按雌雄随机分 7 组, 每组 14 只(雌雄各半), 1-6 组为造模组, 分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、SASP 组和模型组, 第 7 组为正常组, 各组体质量无显著性差异($P > 0.05$). 应用 2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立 UC 大鼠模型^[7-8]. 将大鼠颈背部用 100 g/L Na₂S 脱毛后, 以 20 g/L DNCB 丙酮液 0.25 mL (5 滴)滴背, 1 次/d, 连续 14 d, 在第

15 d 以直径 3 mm 导尿管经肛门插入结肠 8 cm 处, 注入 0.1% DNCB 乙醇 0.25 mL, 在第 16 d 同部位注入 80 mL/L 醋酸溶液 2 mL, 准确计时 10 s 后, 再用 5 mL 生理盐水冲洗. 再饲养 2 wk, 每天观察大鼠大便性状、饮食、毛发、活动状态等, 可以看到大鼠逐渐产生典型 UC 活动期症状, 30 d 后造模完成. 然后, 每组随机抽取大鼠 2 只, 处死后取其结肠, 进行病理检查确认结肠出现的充血、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. 每组每只大鼠分别用乌梅丸液、白头翁汤液、参苓白术散液、痛泻要方液和 SASP 混悬液 3 mL 灌胃, 每天 1 次; 模型组、正常组: 每组每只大鼠均以蒸馏水各 3 mL 灌胃, 1 次/d, 以上均给药 15 d. 全部结肠标本均经 49 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋. TNF- α mRNA 的表达用原位杂交法(采用 TNF- α 的寡核苷酸探针经地高辛高效标记法)检测, 严格按试剂盒说明操作, 最后显微镜观察并拍照. 每组切片随机选取 5 张, 各随机选取 5 个视野, 用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统(版本 9.0)测量, 计算其平均吸光度和平均灰度.

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件处理统计数据资料, 数据用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用 t 检验和 F 分析(q 检验).

2 结果

造模动物于 2 wk 左右出现黏液稀便, 且逐渐加重, 4 wk 左右症状更为严重, 可见脓血便、消瘦、体质量减轻、毛发无光泽、饮食明显减少、畏寒、懒动等. 经理肠四方、SASP 灌胃后, 其症状均有不同程度改善(表 1).

表 1 中药理肠四方对大鼠体质量和组织损伤积分的影响(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	体质量(g)	损伤积分
正常组	12	352.5 \pm 20.7 ^b	0 ^b
模型组	10	3307.8 \pm 15.3 ^d	5.5 \pm 0.45 ^d
SASP 组	9	3321.5 \pm 18.7 ^{ad}	3.8 \pm 0.39 ^a
乌梅丸组	11	3340.3 \pm 16.8 ^{bd}	1.8 \pm 0.34 ^{bf}
白头翁汤组	10	3331.4 \pm 13.8 ^{bd}	2.5 \pm 0.38 ^{bf}
参苓白术散组	9	3325.6 \pm 18.4 ^{ad}	1.9 \pm 0.35 ^{be}
痛泻要方组	10	3328.7 \pm 10.5 ^{ad}	3.7 \pm 0.47 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 正常组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs SASP 组.

2.1 根据炎症损伤程度进行评分^[9-12], 确有改善(表 1). 镜下正常组: 大鼠结肠黏膜完好, 无炎细胞浸润及溃疡形成, 黏膜上皮完整、连续, 腺体排列规则, 结构清楚, 分泌功能活跃, 黏膜、固有膜内血管、纤维等正常, 肌层无异常. 模型组: 大鼠结肠黏膜糜烂、溃疡, 大部分黏膜缺损, 有的形成深大溃疡, 黏膜腺体破坏, 残

存的黏膜充血、水肿、增生形成息肉样外观(假息肉),黏膜及黏膜下大量炎细胞浸润(淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞),有的细胞呈散在分布,处于增生状态(浆多、核大、染色质稀疏);黏膜层变薄、黏膜下固有层局部充血、水肿、纤维增生. SASP 组:大鼠结肠黏膜上皮部分缺损,腺体排列欠规则,黏膜下轻度充血,较多炎细胞浸润. 乌梅丸组:大鼠结肠黏膜上皮基本完整,腺体排列较规则,黏膜下无明显充血,少量炎细胞浸润. 白头翁汤组:大鼠结肠黏膜上皮基本完整,腺体排列规则,黏膜下充血不明显,可见炎性细胞浸润. 参苓白术散组:大鼠结肠黏膜上皮基本完整,腺体排列规则、黏膜充血不明显,可见少量炎性细胞浸润. 痛泻要方:大鼠结肠黏膜上皮欠完整,腺体排列欠规则,黏膜下充血明显. 可见炎性细胞浸润(图 1A-G).

2.2 TNF- α mRNA 的表达 杂交阳性信号为棕黄色颗粒分布于胞质,阳性物质主要位于巨噬细胞、淋巴细胞及纤维母细胞胞质内,呈颗粒状(图 2A-G). 模型组平均吸光度明显高于正常组($P < 0.01$),其平均灰度则明显低于正常组($P < 0.01$);而乌梅丸组平均吸光度低于模型组($P < 0.05$),其平均灰度则明显高于模型组($P < 0.01$);乌梅丸组平均光密度与白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组比较亦有所下降($P < 0.05$),其平均灰度则较之升高($P < 0.05$);而 SASP 组其平均吸光度、平均灰度则与该 3 组无明显差别($P > 0.05$, 表 2).

表2 中药理肠四方对大鼠结肠组织 TNF- α mRNA 的表达情况(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	平均吸光度	平均灰度
正常组	12	0.31 \pm 0.13 ^b	158.21 \pm 12.31 ^b
模型组	10	0.68 \pm 0.16	90.57 \pm 9.73
SASP 组	9	0.48 \pm 0.09	125.36 \pm 11.27
乌梅丸组	11	0.37 \pm 0.11 ^{ac}	140.48 \pm 13.34 ^{bd}
白头翁汤组	10	0.45 \pm 0.15 ^e	130.93 \pm 10.43 ^e
参苓白术散组	9	0.47 \pm 0.14 ^e	127.89 \pm 9.67 ^e
痛泻要方组	10	0.50 \pm 0.13 ^e	123.81 \pm 12.03 ^e

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SASP 组; ^e $P < 0.05$ vs 乌梅丸组.

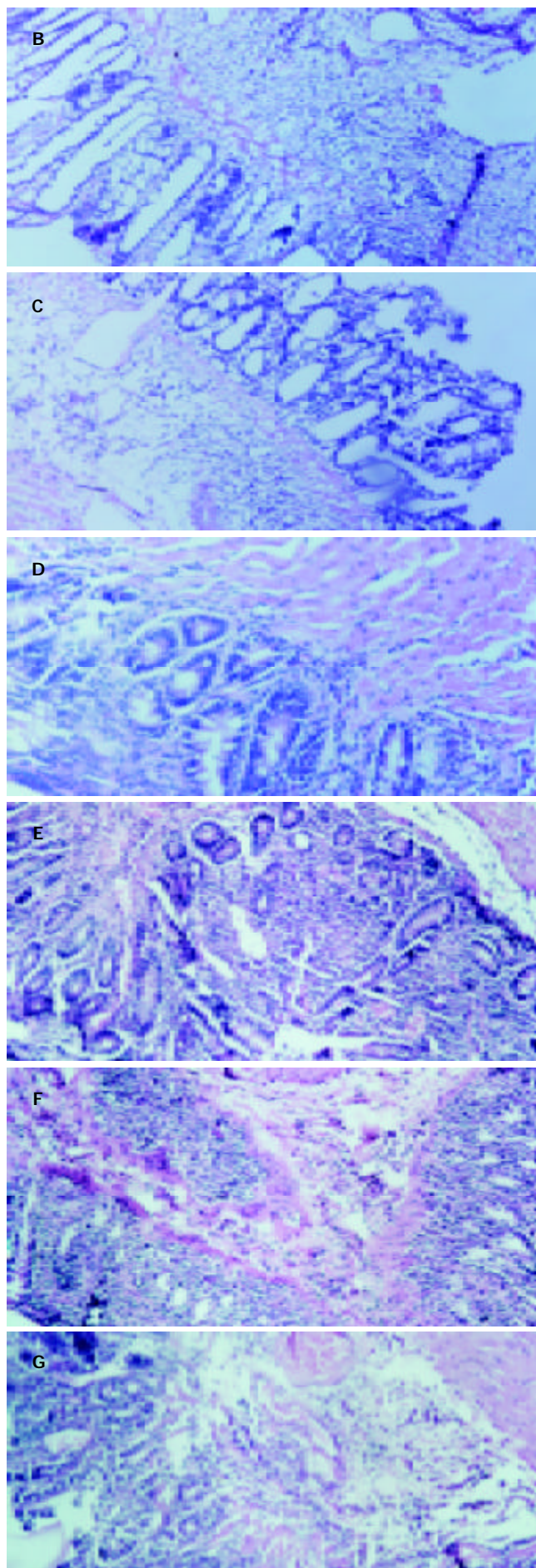
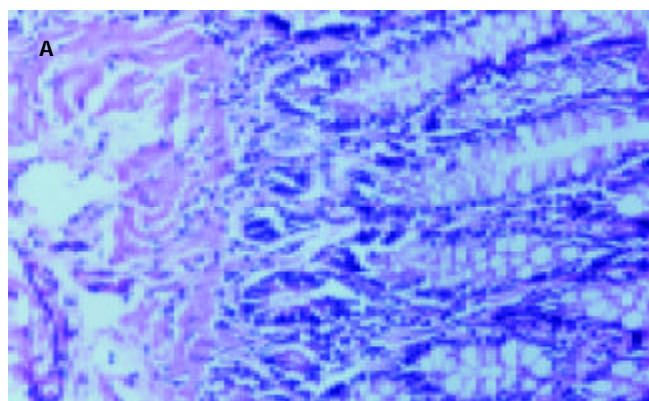


图1 UC 大鼠结肠病理切片 HE \times 200. A: 正常组; B: 模型组; C: SASP 组; D: 乌梅丸组; E: 白头翁汤组; F: 参苓白术散组; G: 痛泻要方组.

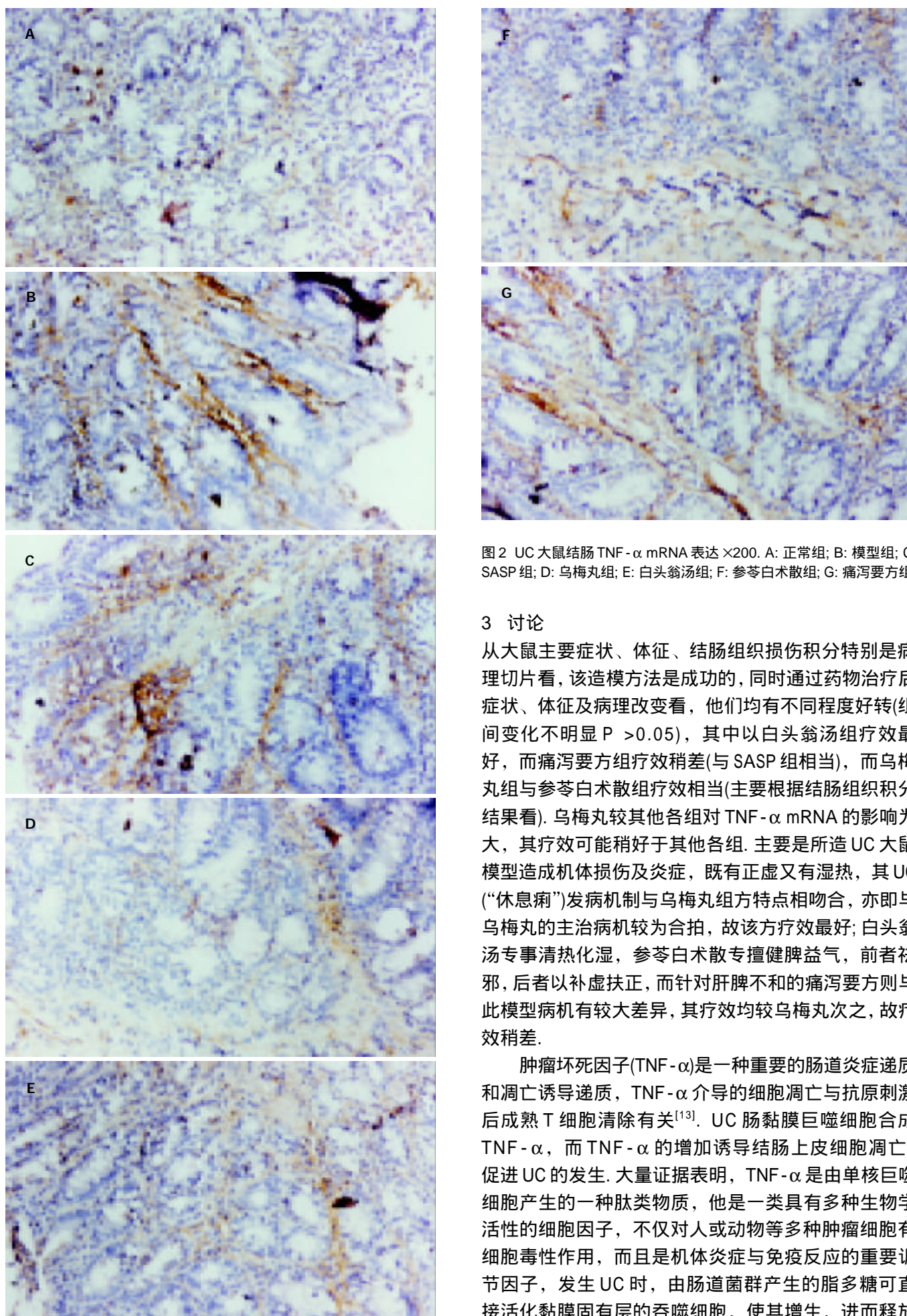


图2 UC 大鼠结肠 TNF- α mRNA 表达 $\times 200$ 。A: 正常组; B: 模型组; C: SASP 组; D: 乌梅丸组; E: 白头翁汤组; F: 参苓白术散组; G: 痛泻要方组。

3 讨论

从大鼠主要症状、体征、结肠组织损伤积分特别是病理切片看, 该造模方法是成功的, 同时通过药物治疗后症状、体征及病理改变看, 他们均有不同程度好转(组间变化不明显 $P > 0.05$), 其中以白头翁汤组疗效最好, 而痛泻要方组疗效稍差(与 SASP 组相当), 而乌梅丸组与参苓白术散组疗效相当(主要根据结肠组织积分结果看)。乌梅丸较其他各组对 TNF- α mRNA 的影响为大, 其疗效可能稍好于其他各组。主要是所造 UC 大鼠模型造成机体损伤及炎症, 既有正虚又有湿热, 其 UC (“休息痢”) 发病机制与乌梅丸组方特点相吻合, 亦即与乌梅丸的主治病机较为合拍, 故该方疗效最好; 白头翁汤专事清热化湿, 参苓白术散专擅健脾益气, 前者祛邪, 后者以补虚扶正, 而针对肝脾不和的痛泻要方则与此模型病机有较大差异, 其疗效均较乌梅丸次之, 故疗效稍差。

肿瘤坏死因子(TNF- α)是一种重要的肠道炎症递质和凋亡诱导递质, TNF- α 介导的细胞凋亡与抗原刺激后成熟 T 细胞清除有关^[13]。UC 肠黏膜巨噬细胞合成 TNF- α , 而 TNF- α 的增加诱导结肠上皮细胞凋亡, 促进 UC 的发生。大量证据表明, TNF- α 是由单核巨噬细胞产生的一种肽类物质, 他是一类具有多种生物学活性的细胞因子, 不仅对人或动物等多种肿瘤细胞有细胞毒性作用, 而且是机体炎症与免疫反应的重要调节因子, 发生 UC 时, 由肠道菌群产生的脂多糖可直接活化黏膜固有层的吞噬细胞, 使其增生, 进而释放

包括 TNF- α 在内的一系列细胞因子, 破坏肠黏膜屏障, 同时血管系统也遭到破坏, 导致一系列 UC 典型的炎症病变. 另外, TNF- α 的分泌是可以调控的, 然而细胞因子调控和释放的确切机制仍不清楚, 是否的确与核因子(NF)- κ B 活化有关^[14], 尚需进一步研究.

4 参考文献

- 1 王青, 许琳. 溃疡性结肠炎的实验室检查和活动性评估. 世界华人消化杂志 2000;8:336-337
- 2 郭洁, 沈志祥, 谭诗云. 炎症性肠病的活动性指标. 世界华人消化杂志 2001;9:1431-1434
- 3 罗燕军, 于皆平. 炎症性肠病活动性的分子标志物. 世界华人消化杂志 2001;9:698-701
- 4 田力, 黄裕新, 闻勤生, 李艳梅, 赵海峰, 王庆莉. 电针治疗溃疡性结肠炎模型大鼠的作用机制. 世界华人消化杂志 2002;10:916-921
- 5 吴兴桂, 王广伟, 侯宪典, 宋豫军, 齐保庆. 炎症性肠病患者血清 Fas, IL-6 的变化. 世界华人消化杂志 2002;10:865-866
- 6 李琪佳, 宫恩聪, 刘叔平, 鄂文. 溃疡性结肠炎黏膜的白细胞亚群和肿瘤坏死因子- α 的表达. 临床与实验病理学杂志 2001;17:216-218
- 7 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军. 复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型及其免疫和超微结构变化. 世界华人消化杂志 1999;7:381-383
- 8 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军, 齐凤. 鱼腥草治疗溃疡性结肠炎的实验研究. 世界华人消化杂志 1999;7:786-787
- 9 郑红斌, 胡鸿毅, 陆雄, 马贵同. 清肠栓防治大鼠溃疡性结肠炎作用的实验研究. 浙江中医学院学报 2001;25:47-51
- 10 Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:150-152
- 11 Padol I, Huang JQ, Hogaboam CM, Hunt RH. Therapeutic effects of the endothelin receptor antagonist Ro 48-5695 in the TNBS/DNBS rat model of colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;12:257-265
- 12 Tjandra K, Le T, Swain MG. Experimental colitis attenuates development of toxin-induced cholangitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002;47:1216-1223
- 13 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P, Ceuppens JL. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 2000;164:3608-3615
- 14 甘华田, 欧阳钦, 贾道全, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B 活化与细胞因子基因表达. 中华内科杂志 2002;41:252-255

World Journal of Gastroenterology 影响因子

影响因子是国际通行的期刊评价指标之一, 是反映期刊重要性的宏观定量指标. 通常影响因子越大, 期刊的学术影响力和作用也越大. 总被引频次是指期刊自创刊以来所刊登的全部论文在统计当年被引用的总次数, 是一个非常客观实际的评价指标, 可以显示该刊被使用和重视的程度, 以及在科学交流中的作用和地位. 美国科学信息研究所(ISI)出版的期刊引证报告(JCR): 《World Journal of Gastroenterology, WJG》2002 年影响因子为 2.532, 被引频次为 1 535. WJG 2002 年影响因子在国际胃肠病学和肝病领域内的 45 种期刊中排名第 13 位, 在 SCI 收录的所有 5876 种国际科学期刊中排名第 797 位. WJG 2001 年影响因子 1.445, 被引频次为 722; WJG 2000 年影响因子 0.993, 被引频次 327 次. 1998 年以来发表的全文电子版(ASP, PDF)已与 PubMed 中的文摘进行了链接, 全世界的读者在利用 PubMed 检索时即可免费阅读到 WJG 发表的全文, 使本刊作者发表的论文在全球得到及时广泛的传播, 期刊的影响因子逐年上升, 国际影响逐年扩大.