

乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠病变结肠粘膜局部肿瘤坏死因子 α 、白介素-8 及白介素-10 的影响

姚茹冰¹ 邱明义² 蔡 辉¹ 胡 兵¹

摘要 目的:探讨乌梅丸治疗溃疡性结肠炎的免疫学机理。方法:采用免疫加局部刺激的方法复制大鼠溃疡性结肠炎模型,灌胃法给药,用酶联免疫法检测大鼠病变结肠粘膜局部组织匀浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-8(IL-8)及白介素-10(IL-10)含量,并进行组间比较。结果:乌梅丸组 TNF- α 、IL-8 含量低于模型组(前者 $P < 0.01$),IL-10 含量高于模型组($P < 0.01$)。结论:中药复方乌梅丸可以通过升高抑炎因子 IL-10 的含量及降低促炎因子 TNF- α 的含量抑制肠道炎症反应的扩大与加剧,提示此为该方治疗溃疡性结肠炎的分子免疫学机理之一。

主题词 结肠炎,溃疡性,中医药疗法 乌梅丸/治疗应用 结肠/药物作用

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是以腹泻、粘液脓血便、腹痛及里急后重为主要症状,以结肠粘膜慢性炎症和溃疡形成病理特点的一种慢性炎症性肠病,被世界卫生组织(WHO)列为现代难治病之一,其病因及治疗药物一直是研究热点。乌梅丸是中医学临床实践中常用于治疗本病卓有良效的基础方。本实验观察乌梅丸对 UC 大鼠病变结肠粘膜局部组织匀浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-8(IL-8)及白介素-10(IL-10)含量的影响,探讨其治疗 UC 的免疫学机理,为乌梅丸治疗溃疡性结肠炎提供一定的实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物:健康 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重 180~220g;健康日本大耳白兔 6 只,雄性,体重 3.5~4.0kg,均由同济医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物:柳氮磺胺吡啶(SASP)由上海三维制药公司生产,规格 250mg/片,批准文号沪卫药准字(1995)第 002083 号。药物制备方法:SASP 片剂研细粉,过 100 目筛,用蒸馏水配制成 8%的混悬液,为防止一次配制放久后变质,用时现配现用。乌梅丸由乌梅 16g,

炮附子 6g,细辛 6g,干姜 10g,黄连 16g,当归 4g,花椒 4g,桂枝 6g,生晒参 6g,黄柏 6g 组成,生药由湖北中医学院专家门诊部中药房提供,湖北中医学院中药研究所协助煎煮,浓缩至每毫升含生药 2g。

1.3 试剂:弗氏完全佐剂由 Gibco 公司生产,武汉亚法生物技术有限公司提供,批号 15721-038。进口分装大鼠 IL-10、TNF- α 、IL-8 定量 ELA 试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供。

1.4 仪器:LD5-2A 型离心机由北京医用离心机厂生产,WZ-2A 型微量振荡器、HH-W21-600 型电热恒温水温箱由上海医用恒温设备厂生产,DG3022A 型酶联免疫检测仪由国营华东电子管厂制造。

1.5 动物分组:将健康 SD 大鼠 40 只随机分为 4 组,即正常对照组、模型组、SASP 组及乌梅丸组,每组 10 只。

1.6 抗原制备:6 只健康日本大耳白兔禁食 18 小时后,用 5ml 一次性注射器耳缘静脉空气栓塞致死,迅速取直肠至回盲部的大肠粘膜,加适量生理盐水用匀浆器制成组织匀浆,-20℃冷冻 24 小时,解冻后以 4000r/min 速度离心 30min,取上清液提纯,用总蛋白试剂盒双缩脲法测定蛋白质含量为 20g/L,冰箱贮存备用,使用时加入等量弗氏完全佐剂一起配成抗原乳化液。

1.7 模型制作:参照徐叔云《药理实验方法学》中的方法^[1],稍作改进并加局部刺激造模。具体方法如下:除正常对照组外,其余各组大鼠均首次于左足跖注射抗原 4mg,于第 10、17、24、31 天分别于右足跖、背部、腹股沟、腹腔内注射抗原 8mg(末次注射不加佐剂)。至血清抗结肠抗体达到一定效价,禁食 24 小时后,用异戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉,然后用 2%甲醛灌肠,留置 1 小时,用生理盐水洗净后排去,再用抗原液(4mg/ml)2ml 灌肠,留置 2 小时,洗净后排去。3 天后,随机抽取 4 只大鼠处死取其结肠,病理确认造模大鼠结肠出现充血、水肿、急慢性炎细胞浸润、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化后,模型形成。造模期间每天注意观察大鼠大便性状、食欲、毛发、

1 南京军区南京总医院中医科,南京市中山东路 305 号 (210002)

2 湖北中医学院研究生部

收稿日期:2002-03-28;修回日期:2002-05-26

活动状态等。

1.8 给药方法:造模结束后,对不同组进行不同的处理。正常对照组:正常条件下喂养,不做任何处理。模型组:以蒸馏水 1ml/100g 体重灌胃,每日 1 次。SASP 组:以 8%SASP 混悬液 1ml/100g 体重灌胃,每日 1 次。乌梅丸组:以乌梅丸水煎剂(每毫升含生药 2g) 1.43ml/100g 体重灌胃,每日 1 次。以上各组给药时间均为 20 天。

1.9 检测指标:造模及用药期间每日观察动物的精神状态、活动情况、毛发光泽度、食量、大便性状等变化情况。用药 20 天后处死全部动物,取病变肠组织剪碎,加生理盐水,用匀浆器制成 20%匀浆,4000r/min 离心取上清液,于 -20℃ 冰箱冻存,即为待检标本,以用于检测 IL-10、TNF- α 、IL-8 的变化。检测程度严格按试剂盒使用说明进行,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检验。

1.10 数据处理方法:数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析选用方差分析和 q 检验。组间比较时, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P > 0.05$ 为差异无显著性。

2 结果

2.1 各组给药前后一般表现变化比较:造模后,除正常对照组大鼠外,其余各组大鼠陆续出现腹泻、稀便甚至粘液血便,伴见精神萎靡、竖毛、拱背、皮毛不洁、食欲差甚至厌食等表现。给药 20 天后,各给药组上述症状均有不同程度的改善,精神好转,食欲增加,无粘液血便,偶有稀便,且乌梅丸组症状改善优于 SASP 组。整个实验过程中,正常对照组大鼠活泼喜动,皮毛光亮,饮食自如,无死亡现象,模型组死亡 3 只, SASP 组死亡 2 只,乌梅丸组死亡 1 只。

2.2 各组大鼠肠组织 TNF- α 、IL-10 与 IL-8 含量变化:附表示,模型组 IL-10 含量与正常对照组相比降低,差异有非常显著性($P < 0.01$)。给药后, SASP 组与乌梅丸组 IL-10 含量均有提高,但前者与模型组相比差异无显著性,后者与模型组相比差异有非常显著性($P < 0.01$)。乌梅丸组与 SASP 组比较差异有非常显著性($P < 0.01$)。模型组 TNF- α 含量与正常对照组相比升高,差异有非常显著性($P < 0.01$)。给药后, SASP 组、乌梅丸组 TNF- α 含量均有所降低,乌梅丸组降低更为显著,与模型组比较差异有非常显著性($P < 0.01$)。模型组 IL-8 含量与正常对照组相比升高,差异有显著性($P < 0.01$)。给药后, SASP 组、乌梅丸组 IL-8 含量均有所降低,差异无显著性,且均与模型组无差异。

附表 各组 IL-10、TNF- α 与 IL-8 含量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-10(pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-8(pg/ml)
正常对照组	9	94.72 $\pm$ 12.08	18.54 $\pm$ 2.74	29.39 $\pm$ 5.92
模型组	6	30.16 $\pm$ 7.33**	58.36 $\pm$ 20.52**	39.00 $\pm$ 3.47**
SASP 组	7	41.16 $\pm$ 16.82**	35.72 $\pm$ 10.76**	37.32 $\pm$ 2.38**
乌梅丸组	8	74.21 $\pm$ 19.31*▲#	22.09 $\pm$ 6.41▲#	36.59 $\pm$ 2.65**

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 SASP 组比较, # $P < 0.01$

3 讨论

现代医学对 UC 发病机理的研究主要集中在感染、遗传和免疫反应异常等方面^[2]。近年来有关 UC 发病的免疫学机理研究取得了较大的进展,从分子水平初步揭示了本病的免疫学发病机制,其中以免疫调节异常导致的组织损伤持续放大学说最受关注。该学说认为,本病的发生可能是由始发以及持续存在的抗原刺激因素引起肠道粘膜免疫活性细胞激活(包括中性粒细胞、巨噬细胞、NK 细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等),T 细胞亚群失衡(以辅助性 T 细胞激活占优势),促炎与抗炎细胞因子平衡被破坏,引起和放大粘膜的炎症,形成肉眼和镜下的 UC 病理改变。与 UC 关系密切的促炎因子有 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α , 抗炎因子主要有 IL-4、IL-10、IL-1ra。其中某些关键因子如 TNF- α 、IL-8 的促炎作用及 IL-10 的抗炎作用已初步阐明^[3]。在治疗方面,对活动期 UC 有效的西药基本上还是以氨基水杨酸类和皮质类固醇类为主,上述两类药物存在停药后易复发、长期用药副反应较多等问题。近年来,国内外学者开展了细胞因子单克隆抗体及拮抗剂治疗 UC 的研究,但尚处于试制阶段^[4]。因此,从中医中药领域寻找更为理想有效、副反应少的药物成为研究重点。

根据 UC 的发病规律及证候学特点,中医学认为,本病归属“泄泻”、“痢疾”、“休息痢”的范畴,并且认为本病病位在肠,涉及脾、胃、肾。病因病机为先天禀赋不足,后天脾胃功能不健,在此基础上感受外邪(以湿邪为主)、饮食不节或忧思恼怒等致脾胃损伤,传导失司,水湿内停,湿邪郁久化热或化寒,壅滞肠间,与气血相搏结,损伤肠络,血腐肉败,化为脓血而下。病程日久,正虚邪恋,形成本虚标实,寒热错杂之证。乌梅丸出自《伤寒论》和《金匱要略》,原治蛔厥及久利。由乌梅、细辛、干姜、黄连、当归、附子、蜀椒、桂枝、人参、黄柏等药组成。方中重用乌梅醋渍以涩肠固脱止泻,桂枝、蜀椒、细辛、干姜、附子辛热温脏散寒,黄连、黄柏清利湿热,当归、人参调补气血,合用则有祛除寒热、调补气血、涩肠止利之功,故适用于寒热错杂、气血亏虚的久泻久痢。

之证。柯琴云：“久利则虚，调其寒热，扶其正气，酸以收之，其利即止”。徐大椿谓其为“治久痢之圣方”。现代药理研究证明，乌梅丸对蛔虫没有直接杀伤作用，但可麻醉虫体，明显抑制其活动能力；可促进胆囊收缩和胆汁排泄，使胆汁分泌量增加，使 pH 值亦随之下降；对奥狄括约肌有明显的弛缓扩张作用；可抑制肠蠕动，降低小肠平滑肌张力；有一定的抑菌作用^[5]。周尔文等的研究表明，正常小鼠灌服乌梅丸后，巨噬细胞吞噬能力及抗疲劳、耐缺氧能力均有明显提高^[6]。迄今为止，未见乌梅丸对 UC 大鼠免疫调节作用尤其是对细胞因子影响的报道。乌梅丸治疗溃疡性结肠炎的临床报道较多，疗效较好。如王佐明用乌梅丸治疗寒热错杂型溃疡性结肠炎 43 例，痊愈 25 例，显效 9 例，有效 6 例^[7]。王劲松等用自拟慢泄散（主要为乌梅丸加减）治疗溃疡性结肠炎 100 例，治愈率为 54%，总有效率为 94%^[8]。

已有多项研究表明，溃疡性结肠炎患者免疫调节功能异常，使得肠道炎症反应持续存在。本实验证明中药复方乌梅丸可以升高溃疡性结肠炎时结肠粘膜局部抑炎因子 IL-10，降低促炎因子 TNF- α 和 IL-8，且前二者与模型组相比有非常显著性差异，同时证实本方治

疗效果较 SASP 为好，升高抑炎因子 IL-10 的作用更显著。结合乌梅丸复方及方中主要药物的现代药理学研究进展，推断乌梅丸治疗 UC 机理与免疫调节作用有密切关系，即通过改善溃疡性结肠炎时的免疫调节机制，使异常上调的免疫反应下调，控制持续扩大的肠道炎症反应，达到治疗的目的。

参考文献

- 1 徐叔云，卞如濂，陈修. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1991：891.
- 2 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology, 1998, 115(1): 182-205.
- 3 欧阳钦. 炎症性肠病的病因和发病机理. 临床内科杂志, 1998, 15(2): 59-60.
- 4 巫协宁. 加强细胞因子对炎症性消化病发病机制及其拮抗剂的研究. 胃肠病学, 1998, 3(2): 65.
- 5 谢鸣. 中医方剂现代研究. 北京：学苑出版社，1997：1755.
- 6 周尔文，张国俊，魏连海，等. 乌梅丸对小鼠巨噬细胞吞噬功能等项实验的观察分析. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(3): 65.
- 7 王佐明. 乌梅丸、固肠丸治疗溃疡性结肠炎. 四川中医, 1991, 9(12): 29-30.
- 8 王劲松，王召龙. 自拟慢泄散治疗溃疡性结肠炎 100 例. 国医论坛, 1996, 12(2): 32.

出类拔萃 全凭实力

—— 规模 · 品质 · 价格 · 服务 ——

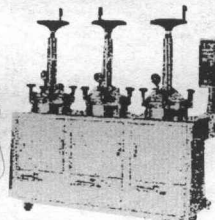
我产完全以实力取胜
多的选择，美廉的产品，便捷的通路，
完善的服务，尽在如此实力间。
选择东华，得到更多！

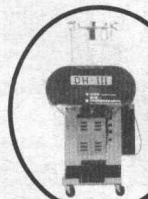
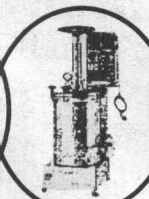
- ◆ 6大系列
- ◆ 25种型号任您选择
- ◆ 30个办事处遍布全国
- ◆ 100位维修工程师为您服务

● 诚征各地区经销商 ●

东华牌

中药煎药机
液体包装机



医院药店 煎药之选

北京东华原医疗设备有限责任公司 总部地址：北京市昌平区科技园南区超路1号 邮编：102200 电话：(010)89718013/8014/8047/8049/8053/8094 传真：(010)89718021

北京办地址：北京市朝阳区安定路35号安华发展大厦630/628室 热线电话：(010)64423480 64436460 64418135 64418139 传真：64423476 邮编：100029

E-mail: sales@donghuagroup.com 网址: www.donghuagroup.com

(广告编号: 20021218)