

肠炎康口服液治疗大鼠实验性溃疡性结肠炎的实验研究

高文艳¹ 李有田¹ 李晓春¹ 郭玉芳²

摘要 目的:观察不同剂量肠炎康口服液(CHYK)对大鼠实验性溃疡性结肠炎(UC)的影响,探讨UC的发病机制及CHYK对UC的治疗机理。方法:将动物按体重随机分为大、中、小剂量CHYK组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组、模型对照组和正常对照组。除正常对照组外其余5组均用人结肠粘膜匀浆上清蛋白制作UC大鼠模型。连续用药5周后,取外周血测CD₄、CD₈T淋巴细胞亚群,取结肠组织测超氧化物歧化酶(SOD)活性,丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)水平。结果:模型对照组大鼠MDA和NO水平较正常对照组显著升高($P<0.05$),SOD活性显著降低($P<0.05$),其他组较模型对照组均有不同程度降低或升高。但CD₄、CD₈T淋巴细胞比例各组间差异无显著性($P>0.05$),CD₄/CD₈比值亦无显著变化($P>0.05$)。结论:结肠粘膜免疫系统失调是UC的重要发病机制,CHYK对UC的治疗机理可能是调节了紊乱的免疫状态。

主题词 结肠炎,溃疡性/中医药疗法 @ 肠炎康口服液

肠炎康口服液(CHYK)是我院院内中药制剂,具有健脾止泻、理气止痛之效,主治溃疡性结肠炎(UC),临床应用疗效显著。为探讨UC的发病机制及CHYK对UC的治疗机理,进而指导临床,本实验观察了实验性UC大鼠的结肠粘膜病理改变,外周血中CD₄、CD₈T淋巴细胞亚群,结肠组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性,丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)水平,及不同剂量CHYK对大鼠实验性结肠炎的影响,为临床实践提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料:(1)实验动物:Wistar雄性大鼠85只,购自吉林大学实验动物部,体重150g,8~10周龄。(2)药物及试剂:CHYK由吉林大学第一医院中药制剂室提供(批号20010812,含黄芪30g,山药20g,白头翁30g等),浓度分别为250%、500%、1000%;柳氮磺胺吡啶(SASP,批号200107020)片由上海三维制药有限公司生产,粉碎过筛,用缩甲基纤维素钠(CMC)配制成1.5%的混悬液。CD₄、CD₈单克隆抗体(分别标记异硫氰酸荧光素和藻红蛋白)6均为小鼠抗大鼠单克隆抗体,为美国Caltag产品;SOD、MDA、NO测定试剂盒由南京建成生物工程研究所生产。(3)主要仪器:流式

细胞仪由美国Becton生产,721分光光度计由中国上海生产。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立^[1,2]:动物称重,随机分为2组。正常对照组14只,造模组71只;模型制作前将抗原,即人结肠粘膜上清蛋白的上清液与完全弗氏佐剂用混和仪按体积1:1配制成油包水乳液;模型组大鼠首次每只足跖趾内注射乳剂(含抗原量约2.5mg),于第10、17、24、31天分别于后腿内侧皮下、背部皮下、腹股沟、腹腔内注射乳剂(含抗原量约5.0mg),末次不加佐剂;造模期间,每日观察大鼠大便情况、活动等状况。每3天测1次便潜血;造模时间40天。造模结束后,在正常组和造模组各随机抽取大鼠4只,观察结肠粘膜病理改变,验证造模是否成功。

1.2.2 分组及给药方法:造模结束后,将模型组(51只,造模期间本组大鼠死亡20只)和正常对照组大鼠(14只)各随机抽取4只,戊巴比妥钠全身麻醉(50mg/kg)后剖取结肠标本,观察病理学改变。从第41天起,将模型组(17只)按体重随机分为5组,模型对照组和CHYK大剂量组各10只,SASP组和CHYK中、小剂量组各9只。模型对照组和正常对照组给予0.5% CMC溶液,阳性对照组即SASP组,给予SASP混悬液,CHYK大、中、小剂量组分别给予1000%、500%、250%的CHYK溶液。每只大鼠每次灌胃量为10ml/kg,每天两次。时间为5周。

1.2.3 检测指标:流式细胞术测定CD₄、CD₈T淋巴细胞亚群^[3]:(1)淋巴细胞的分离;(2)淋巴细胞的免疫荧光染色;(3)流式细胞仪检测;(4)结果判定方法用二维点阵图。SOD、MDA、NO的检测:(1)结肠组织匀浆的制备:麻醉大鼠,剖取结肠,漂洗、称重、剪碎,制成10%组织匀浆,离心,取适量上清液,双缩脲法定蛋白,余量进行指标测定;(2)指标的检测:均严格按照各测定试剂盒操作程序进行操作,比色,带入公式算出结果。

1.2.4 统计学处理:采用方差分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及病理改变:模型组大鼠2周左右出现大便潜血阳性。4周左右出现脓血便,伴食欲减

基金项目:吉林省中医管理局资助项目(98A33)

1 吉林大学第一医院中医科,长春市新民大街1号(130021)

2 吉林大学基础医学院病理科

收稿日期:2002-07-26;修回日期:2003-02-20

表 1 治疗后各组间检测指标比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数(只)	CD ₄ (%)	CD ₄ (%)	CD ₄ /CD ₈	SOD(NU/g)	MDA(nmol/mg prot)	NO(μ mol/g prot)
模型对照组	8	55.48 $\pm$ 7.30	22.34 $\pm$ 5.50	2.57 $\pm$ 0.53	121.22 $\pm$ 34.29	1.42 $\pm$ 0.30	0.68 $\pm$ 0.13
正常对照组	10	52.91 $\pm$ 8.29	29.40 $\pm$ 11.82	2.04 $\pm$ 0.71	179.46 $\pm$ 38.78*	0.88 $\pm$ 0.29*▲	0.30 $\pm$ 0.12*▲
CHYK 大剂量组	8	50.44 $\pm$ 12.95	22.30 $\pm$ 8.54	2.49 $\pm$ 0.82	164.34 $\pm$ 28.80*	0.79 $\pm$ 0.27*△▲	0.42 $\pm$ 0.10△
CHYK 中剂量组	9	51.64 $\pm$ 6.06	25.10 $\pm$ 7.25	2.26 $\pm$ 0.88	181.72 $\pm$ 31.29*	1.07 $\pm$ 0.23*	0.30 $\pm$ 0.10*▲
CHYK 小剂量组	8	61.14 $\pm$ 5.16	24.70 $\pm$ 9.97	2.76 $\pm$ 0.87	176.01 $\pm$ 31.09*	1.04 $\pm$ 0.21*	0.30 $\pm$ 0.10*▲
SASP 组	8	51.38 $\pm$ 3.32	24.30 $\pm$ 7.18	2.34 $\pm$ 0.98	167.02 $\pm$ 27.00*	1.20 $\pm$ 0.38△	0.43 $\pm$ 0.08△

与模型对照组比较,* $P<0.05$;与正常对照组比较,△ $P<0.05$;与 SASP 组比较,▲ $P<0.05$

表 2 治疗后各组大鼠结肠粘膜损伤评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	损伤评分
模型对照组	8	9.75 $\pm$ 2.82
CHYK 大剂量组	8	4.00 $\pm$ 1.85*
CHYK 中剂量组	9	3.44 $\pm$ 1.33*
CHYK 小剂量组	8	4.13 $\pm$ 1.55*
SASP 组	8	4.00 $\pm$ 2.00*

与模型对照组比较,* $P<0.05$ (粘膜损伤评分标准:观察结肠粘膜表层糜烂或溃疡,炎症细胞浸润,隐窝炎或隐窝脓肿,腺体萎缩或变形和杯状细胞减少 5 项,每项无评为 0 分,依轻重分别为 1、2、3 分,然后计总分)

退,消瘦,倦怠懒动,竖毛,皮毛不洁等。经治疗 CHYK 及 SASP 组大鼠均在 3 周左右止泻。5 周左右大便潜血消失。模型对照组部分大鼠实验结束时仍有粘液便。治疗期间有大鼠死亡,模型对照组和 CHYK 大剂量组各 2 只,SASP 组及 CHYK 小剂量组各 1 只。造模结束时正常组与模型组结肠病理改变:肉眼所见,正常组结肠粘膜表面光滑,附有少许粘液,粘膜皱襞规整,皱襞下血管纹理清晰可见。模型组结肠粘膜形态不规整,颜色较暗,血管纹理模糊,有较多污秽分泌物;光镜所见,正常组结肠粘膜上皮完整,腺体及杯状细胞较多且排列规整,粘膜固有层有少量淋巴细胞存在。模型组结肠粘膜缺损,肠腔表面有大量坏死组织。其下方为肉芽组织和浆细胞、淋巴细胞浸润,毛细血管增生,腺体被破坏消失,杯状细胞减少。上述表示模型制作成功。

2.2 治疗后各组间检测指标比较:表 1 示,模型对照组大鼠结肠粘膜中 SOD 活性下降,MDA 和 NO 水平升高,CHYK 和 SASP 可调节这种异常。CHYK 中、小剂量对 NO 的下调作用优于 SASP 组,外周血中 CD₄、CD₈T 淋巴细胞及其比值无显著变化。

2.3 各组大鼠结肠粘膜病理变化比较:肉眼所见,模型对照组结肠粘膜形态不规整,颜色较暗,血管纹理模糊。各 CHYK 治疗组及 SASP 治疗组部分大鼠结肠粘膜轻度充血,血管纹理欠清晰,附少许粘液,部分大鼠结肠粘膜基本恢复正常。光镜所见,模型对照组大鼠结肠粘膜不完整,肠腺隐窝仍有坏死组织,粘膜固有层中有大量

淋巴细胞浸润,病灶周围腺体有不同程度萎缩或变形,杯状细胞减少。CHYK 各组及 SASP 组结肠粘膜上皮明显恢复,固有层及粘膜下层炎症细胞明显减少,有的基本恢复正常。各治疗组大鼠结肠粘膜损伤评分明显低于模型对照组,差异有显著性($P<0.05$)。见表 2。

3 讨论

溃疡性结肠炎发病脾胃虚弱为其根本,湿热内蕴为其标实,肝郁、气滞、血瘀贯穿疾病始终。故肠炎康口服液组方从疾病的病因出发,取黄芪、山药健脾益气,是以治本,取白头翁、黄柏等清热化湿理肠,是以治标,又佐疏肝理气活血之品,是以效验。

现代医学对 UC 的病因和发病机制迄今未明,但越来越多的资料显示,免疫失调在疾病的发病过程中起关键作用。有大量资料显示,T 细胞在 UC 的发病机制中占有重要地位^[4,5],并认为 UC 是以不能下调肠粘膜中的免疫反应为特征性疾病,存在 CD₄/CD₈ 比值的增高。本实验因考虑动物模型制作过程中的免疫途径(非经肠免疫)与可能实际存在的免疫途径(经肠免疫)不同,产生免疫反应的效应方式亦可能不一样。经肠免疫,肠道抗原成分激活肠道相关淋巴组织,活化的淋巴细胞归巢,最后选择性定居于肠粘膜固有层和肠粘膜上皮;非经肠免疫时,外源性抗原进入体内,激活淋巴细胞(主要是 CD₄T 淋巴细胞),但由于激活的淋巴细胞缺乏肠粘膜淋巴细胞所具有的选择性的“定居分子”(可能是整合素和 $\alpha_4\beta_7$),于是活化的 T 淋巴细胞不仅分布于肠粘膜,而且在外周血中也会有分布,从而使外周血发生改变。故实验取外周血为观察对象,以检测外周血中 T 淋巴细胞亚群的变化。在本实验中 CD₄、CD₈T 淋巴细胞及其比值在各组间差异无显著性($P>0.05$)。本研究认为,这可能是由于 CD₄T 淋巴细胞受抗原激活后,导致抗原特异性的 CD₄T 淋巴细胞克隆扩增,引起 CD₄T 细胞数目增加,但这些扩增细胞将分布于全身,血中 CD₄T 细胞应有所增加,但本实验未显示显著性差异,考虑与样本例数较少有关。而且有实验证明 CD₄T 细胞的这种外周扩增是极为有限的。另外,

CD₄T 细胞受抗原激活后也会导致活化诱导的细胞凋亡增加。故综合分析,CD₄T 细胞可无变化。而外周血中 CD₈T 细胞不存在可能由遗传基因赋予的结肠粘膜内淋巴细胞的诱导缺陷和凋亡敏感,故 CD₈T 淋巴细胞未发生变化。从而 CD₄/CD₈ 比值也无变化。这提示,UC 发病可能主要是结肠粘膜免疫系统调节的缺陷,而非全身性的。这与有些学者认为的 UC 的中心发病机制是肠粘膜中免疫调节异常的观点相一致。

通过对比各组间大鼠结肠粘膜变化,证实 CHYK 治疗 UC 有效。但 CHYK 作为中药复方制剂可以从多角度发挥疗效。因在 UC 有多种血清学及组织化学指标的改变,这些指标的改变最终也要通过免疫炎症的触发、持续和扩大在 UC 的发病中起作用,故调节免疫无疑有助于疾病的恢复。已经证明 UC 肠粘膜中自由基生成过量。这种异常的上调参与 UC 的发病,除了其自身的过氧化作用外,同其参与免疫调节过程也有关系。有研究显示,UC 中氧自由基产生过量,其主要是通过吞噬细胞尤其是中性粒细胞“呼吸爆发”形成的^[6],而粘膜的损伤可继发引起来自血液中的炎症细胞的粘附聚焦,进一步引发炎症扩大。在炎症细胞的粘附聚集过程中,粘附分子起重要作用^[7,8]。在 UC 患者中已经发现粘附分子的高表达状态^[9,10]。本实验选择 MDA、SOD 为检测指标,实验结果表明,CHYK 无论在减少自由基生成,还是在增加自由基清除剂形成方面均有疗效,同时亦不排除 CHYK 通过影响细胞粘附分子而间接起作用。有体外实验显示,氧自由基清除剂如 SOD,可抑制细胞核转录因子(NF)- κ -B 活性,而 NF- κ -B 作为一个独特的转录因子是炎症和免疫反应的多向性调节剂,其可通过激活炎症细胞的转录直接或间接地调节粘附分子的表达。在 UC 中,过量的致病性的 NO 主要来源于诱导型一氧化氮合酶(iNOS),而研究发现,UC 患者结肠粘膜层恰以上调的 iNOS 为主^[11,12],后者可受 TNF、IFN 和 LPS 等的刺激而活性增强或基因表达增加,且其水平与患者肠道的炎症性病变成平行关系^[13]。本实验结果显示,CHYK 对 NO 有下调作用,作用途径可能是抑制 TNF、IFN 等刺激因子使 iNOS 基因表达减少或活性减弱,也可能是对 iNOS 产生的直接作用。NO 能诱导 Th₂ 相关细胞因子 IL-4 及 IL-12 同二聚体表达,而 IFN- γ 、IL-12 则受到抑制^[14]。这恰与一些学者认为在 UC 选择性激活 Th₂ 的观点相符,因而 CHYK 对 UC 的治疗也可能通过 NO 间接调节 Th₁/Th₂ 细胞平衡而起作用。

总之,CHYK 可从多方面发挥治疗作用而以免疫调节作用尤为突出。通过调节免疫,可以使机体免疫紊

乱状态趋于正常,从而从发病的内在机制上保证了疾病的控制。另外,CHYK 中单味药尚有抗菌消炎、调节不良情绪、缓解心理压力、解痉止痛、促进创面修复的作用,也可能参与了疾病的恢复,至于如何发挥效应尚待进一步研究。

参考文献

- 1 徐淑云主编. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社,1982:891.
- 2 李杨. 溃疡性结肠炎动物模型的建立方法. 中药新药与临床药理, 1999,10(2):120-122.
- 3 沈美心,周汝麟主编. 现代免疫学实验技术. 武汉:湖北科学技术出版社,1998:282-285.
- 4 Perez-Machado MA, Espinosa LM, de la Madrigal EJ. Impaired mitogenic response of peripheral blood T cell in ulcerative colitis is not due to apoptosis. Dig Dis Sci, 1999,14(12):2530-2537.
- 5 Camogli L, Te Velde AA, Tigter AJ. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Dis, 1998,4(4):285-290.
- 6 Macdonald TT, Monteleone G, Pender SLF. Recent development in the immunology of inflammatory bowel disease. Scand J Immunol, 2000,51:2-9.
- 7 Yang H, Uara DK, Stephan R, et al. Intercellular adhesion molecule 1 gene associations with immunologic subsets of inflammatory bowel disease. Gastroenterology, 1995,109:440-480.
- 8 Schuermann GM, ABER-bishop AE, Facer P, et al. Altered expression of cell adhesion molecules in uninvolved gut in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol, 1993,94:341-347.
- 9 Vainer B. Role of cell adhesion molecules in inflammatory bowel diseases. Scand J Gastroenterol, 1997,32(5):401-410.
- 10 Pooley N, Ghosh L, Sharon P. Up-regulation of E-selectin and intercellular adhesion molecule-I differs between crohn's disease and ulcerative colitis. Dig Dis Sci, 1995,40(1):219-225.
- 11 陈吉. 一氧化氮与溃疡性结肠炎. 国外医学内科学分册, 1996,23(8):323-325.
- 12 Perner A, Andresen L, Normark M, et al. Expression of nitric oxide synthases and effects of L-arginine and L-NMMA on nitric oxide production and fluid transport in collagenous colitis. Gut, 2001,49:387-394.
- 13 Kimura H, Hokari R, Miura S, et al. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. Gut, 1998,42:180-187.
- 14 余传霖,熊思东主编. 分子免疫学. 上海:复旦大学出版社,上海医科大学出版社,2001:807-808.

风湿病专科培训班招生

本校为风湿病专科培训基地,办学6年来,已培养了大批专科人才,校长陶纪志治疗风湿病积累了10余年的治疗经验。本校主要传授中药内服外用治疗风湿病的新疗法及类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、无菌性骨坏死、肩周炎、坐骨神经痛、椎间盘突出症、颈椎、腰椎、膝关节等部位的骨质增生、产妇受寒引起的腰腿痛、麻、凉等治疗方法。

本校常年招生,每月1日、20日开课,学期10天,汇10元报名费索取详细资料及入学通知书。学习期满成绩合格者发邢台市教委统一印制的钢印结业证书。

地址:河北省巨鹿县朝阳路中医风湿病专科培训学校,邮编:055250,电话:(0319)4338888,联系人:李老师。

广告编号:2003-18