

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.20.015

清热燥湿凉血方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织修复的影响

张夏梦¹, 寿折星^{2*}, 范恒², 石月萍³

(1. 宜昌市第二人民医院, 湖北省宜昌市西陵路 21 号, 443000; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院; 3. 辽宁医学院附属第一医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102690)

摘要 **目的** 探讨清热燥湿凉血方治疗溃疡性结肠炎 (UC) 的可能作用机制。 **方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、艾迪莎组、中药组, 每组 10 只。模型组、艾迪莎组、中药组用三硝基苯磺酸/乙醇复合法局部灌肠建立 UC 大鼠模型, 24 h 后正常组和模型组以生理盐水 1 ml/100 g 灌肠, 艾迪莎组以艾迪莎混悬液 (浓度为 5 g/L) 1 ml/100 g 灌肠, 中药组予以清热燥湿凉血方混悬液 (含生药 1 g/ml) 1 ml/100 g 灌肠, 每天 1 次, 各组均灌肠 15 天。取结肠组织进行病理学观察, 免疫荧光染色检测结肠组织 CK20、CD34 蛋白的表达, RT-PCR 技术检测结肠组织 CK20、CD34、核因子- κ B (NF- κ B) mRNA 的表达。 **结果** 模型组、艾迪莎组、中药组 CK20、CD34 蛋白及 mRNA 的表达均明显高于正常组 ($P < 0.01$), 艾迪莎组和中药组 CK20、CD34 蛋白及 mRNA 表达均明显高于模型组 ($P < 0.01$); 艾迪莎组、中药组 NF- κ B mRNA 表达明显低于模型组 ($P < 0.01$)。 **结论** 清热燥湿凉血方能促进 UC 大鼠结肠组织上皮修复和结肠微血管生成, 抑制结肠组织 NF- κ B 的表达, 可能是治疗 UC 的作用机制之一。

关键词 清热燥湿凉血方; 溃疡性结肠炎; 核因子- κ B

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一类病因尚未完全明确的肠道非特异性炎症性疾病, 黏膜局部长期炎症导致结肠黏膜面瘢痕形成, 进而大肠失去对营养物质的再吸收功能。如何让 UC 患者结肠黏膜上皮再生及微血管再生成为治疗的重要目标之一。我们临床以清热燥湿凉血方组方治疗 UC 取得良好疗效^[1-2]。本研究通过检测 UC 大鼠结肠黏膜组织细胞角蛋白 20 (CK20)、CD34、核因子- κ B (NF- κ B) 的表达, 了解结肠组织黏膜恢复程度及清热燥湿凉血方的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 40 只, 6~8 周龄, 雌性, 体重 (250 ± 20) g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 实验动物合格证号 SCKY (鄂) 2008-0005。

1.2 实验药品及制备

清热燥湿凉血方: 青黛、白及、地榆、苦参、

白头翁、三七、乌梅、甘草, 各成分均按照 1:1 比例配制, 水煎醇沉法配制中药混悬液, 含生药 1 g/ml; 艾迪莎 (美沙拉秦缓释颗粒剂, 益普生公司, 批号 H20040727), 配制混悬液药物浓度为 50 g/L。

1.3 主要试剂和仪器

2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (Sigma 公司, P2297); 兔抗大鼠 CK20 单克隆抗体 (Abcam 公司, ab76126); 兔抗大鼠 CD34 单克隆抗体 (Bioss 公司, bs-0217R); NF- κ B p65 多克隆抗体 (Santa-Cruz 公司, sc-8000); TRIzol (Invitrogen 公司, 15596-026); 浓缩型 DAB 显色剂 (Bioss 公司, C-0010); 羊抗小鼠 IgG 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, BA1001); SABC2Cy3 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, SA2001); DAPI (Sigma 公司, D9564); 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司, K1622); SYBR Green 定量 PCR 试剂盒 (Roche 公司, 04673484001); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, ABI7900HT); 荧光显微镜带自动照相和数字成像装置 (Olympus 公司, BX58)。

* 通讯作者: 36747601@qq.com, (027) 85726395

1.4 模型制备

用三硝基苯磺酸 (TNBS) /乙醇复合法^[8] 局部灌肠建立 UC 大鼠模型。在禁食不禁饮 24 h 条件下, 用 10% 的水合氯醛每 3 ml/kg 腹腔注射麻醉, 麻醉后将内径约 2 mm 的导尿管从肛门缓慢插入约 8 cm, 向导尿管内注入 50% 的乙醇 0.25 ml, 继而注入 0.6 ml TNBS, 提起大鼠尾部倒立约 30 s, 待清醒后自由进食和饮水。大鼠出现竖毛、活动减少、饮食减少, 并出现稀便和黏液脓血便, 说明 UC 造模成功。

1.5 动物分组及给药方法

采用随机数字表法将 40 只大鼠分为正常组、模型组、艾迪莎组、中药组, 每组 10 只。模型组、艾迪莎组、中药组建立大鼠 UC 模型。24 h 后正常组和模型组以生理盐水 1 ml/100 g 灌肠, 艾迪莎组以艾迪莎混悬液 1 ml/100 g 灌肠, 中药组予以清热燥湿凉血方混悬液 1 ml/100 g 灌肠。每天 1 次, 各组均灌肠 15 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 结肠组织病理检测 15 天后留取大鼠远端结肠组织长约 8 cm, 取病变明显的结肠组织一部分迅速置于液氮中保存; 另一部分置于 10 倍标本体积以上的 10% 甲醛溶液中, 24 h 内石蜡包埋并 HE 染色切片。

1.6.2 免疫荧光染色检测 结肠组织连续切片、烤片、脱蜡复水; 抗原修复后, 3% H₂O₂ 室温避光下孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次; 滴加正常山羊血清封闭液, 室温封闭 30 min; 滴加一抗, 置于湿盒中, 4℃ 过夜; 滴加生物素化羊抗大鼠抗体, 37℃ 湿盒孵育 30 min; 加 SABC-CY3 室温 30 min (避光); PBS 洗 3 次, 甘油封片; 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 进行核复染; 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 在荧光显微镜下观察采集图像。各组结肠组织切片按以上步骤处理后, 在荧光显微镜下, FAM 激发波长 $\lambda = 500$ nm, 观察采集位于细胞核内的黄绿色荧光图像。DAPI 激发波长 $\lambda = 370$ nm, 观察采集细胞核内的蓝色荧光图像。CY3 激发波长 $\lambda = 540$ nm, 观察采集位于细胞浆的红色荧光。应用 Image-pro3 Dss. 1 图像处理软件进行图片扫描、取图、图像叠加。结果判断: CK20、CD34 阳性表达为细胞质呈红色荧光。阳性表达细胞计数标准: 每张切片随机选取 5 个高倍视野 ($\times 400$), 分别计数 200 个细胞, 计算阳性细胞百分比。

1.6.3 RT-PCR 法检测 按照 TRIzol 试剂盒说明

书提取结肠组织细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA。取 2 μ l 转录产物作模板, 引物序列 (金斯瑞生物科技有限公司合成) 如下: β -actin 上游引物: 5'-CAC-GATGGAGGGGCCGACTCATC-3', β -actin 下游引物: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3', 扩增长度 240 bp; CK20 上游引物: 5'-ATGCGGATA-ACTGTGGAAGC-3', CK20 下游引物: 5'-CCTC-CACGTTGACATTGTTG-3', 扩增长度 187 bp; CD34 上游引物: 5'-ACTTCTGTTGCCTCGGAGAA-3', CD34 下游引物: 5'-ACGGTTGGGTAAGTCTGTGG-3', 扩增长度 248 bp; NF- κ B 上游引物: 5'-CCGT-GAGGCTGTTTGGTTTG-3', NF- κ B 下游引物: 5'-GGTCTGCCCTCCTGACTCTA-3', 扩增长度 92 bp。反应条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 25 s; 30 个循环, 72℃ 4 min, 4℃ 4 min。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法分析各组相对基因表达差异。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 各组大鼠结肠组织病理变化

图 1 示, 正常组大鼠结肠黏膜结构完整、连续, 腺体排列整齐清晰, 黏膜内血管基质和纤维间质正常, 肌层正常; 模型组大鼠结肠组织有明显的充血水肿, 黏膜结构异常, 伴坏死和糜烂, 部分黏膜上皮损伤脱落, 杯状细胞减少, 炎性细胞浸润全层; 艾迪莎组大鼠结肠黏膜结构尚完整, 上皮损伤减少, 杯状细胞增多, 充血水肿较轻, 溃疡较浅表, 炎性细胞浸润少见; 中药组大鼠结肠黏膜结构尚完整, 上皮细胞、杯状细胞增多, 水肿较轻, 炎症细胞浸润少见。

2.2 各组大鼠结肠组织 CK20、CD34 蛋白表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组、艾迪莎组、中药组 CK20、CD34 阳性细胞均明显升高 ($P < 0.01$); 艾迪莎组和中药组 CK20、CD34 阳性细胞

表 1 各组大鼠结肠组织 CK20、CD34 蛋白表达比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CK20 阳性细胞	CD34 阳性细胞
正常组	10	2.41 $\pm$ 0.11	1.21 $\pm$ 0.63
模型组	10	10.73 $\pm$ 0.23*	7.25 $\pm$ 0.96*
艾迪莎组	10	31.09 $\pm$ 0.61* Δ	19.90 $\pm$ 0.42* Δ
中药组	10	29.31 $\pm$ 0.94* Δ	20.85 $\pm$ 0.31* Δ

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

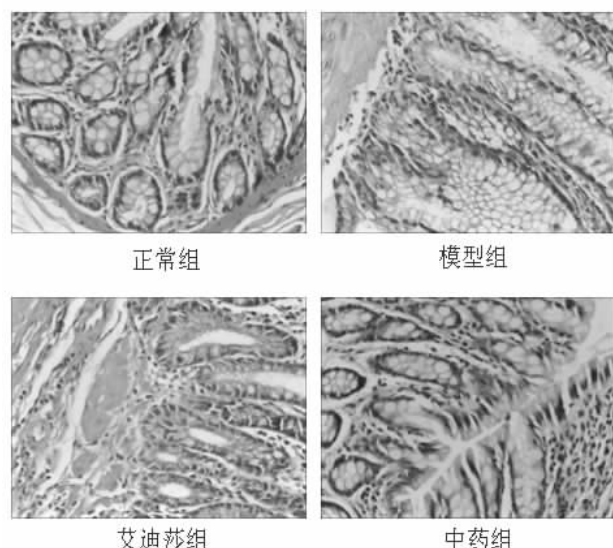


图1 各组大鼠病变结肠组织病理结果(HE染色, ×200)

均明显高于模型组 ($P < 0.01$), 而艾迪莎组和中药组 CK20、CD34 阳性细胞比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠结肠组织 CK20、CD34、NF- κ B mRNA 表达比较

表2示, 与正常组比较, 模型组、艾迪莎组、中药组 CK20、CD34、NF- κ B mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 艾迪莎组、中药组 CK20、CD34 mRNA 表达明显升高, NF- κ B mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); 艾迪莎组与中药组 CK20、CD34、NF- κ B mRNA 表达比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表2 各组大鼠结肠组织 CK20、CD34、NF- κ B mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CK20	CD34	NF- κ B
正常组	10	1.102 ± 0.089	1.035 ± 0.764	1.091 ± 0.095
模型组	10	2.590 ± 0.138*	3.579 ± 0.824*	25.314 ± 0.357*
艾迪莎组	10	5.356 ± 0.667* Δ	6.098 ± 0.145* Δ	10.570 ± 0.354* Δ
中药组	10	5.981 ± 0.465* Δ	5.510 ± 0.275* Δ	11.802 ± 0.258* Δ

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

中医药治疗 UC 具有一定的优势和特点^[4-5]。UC 患者在发作期部分表现为脓血便、里急后重、肛门灼热、口干口苦、舌暗红苔黄腻、脉滑数, 中医辨证为湿热证。由于脾胃受损, 湿聚不化, 蕴久成热, 伤及肠络, 导致血败肉腐。治当清热燥湿、凉血止血、解毒敛疮, 以清热燥湿法凉血组方治疗 UC 取得良好疗效^[6-7]。本方中苦参为君药, 具有

清热燥湿之功效, 用于肠胃湿热所致的泄泻、痢疾及便血; 配用白头翁清热解毒、凉血止痢, 且有燥湿之效; 青黛清热解毒、凉血止血, 地榆治便血, 白及收敛止血, 三药合用, 共奏凉血、止血、敛疮之效; 乌梅涩肠止痢; 三七活血化瘀; 甘草可清热解毒、缓急止痛, 尤宜于脘腹挛急作痛, 且可以调和药性。诸药相合, 为对症治疗此病的良方。

免疫异常是 UC 发病的重要因素, NF- κ B 与 UC 的发生发展密切相关。NF- κ B 通路能调控肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素 6 (IL-6) 等介导 UC 发病^[8]。本实验结果证明, 模型组、艾迪莎组、中药组 NF- κ B 表达高于正常组, 但艾迪莎组、中药组 NF- κ B 表达较模型组降低, 说明清热燥湿凉血方能有效抑制 UC 炎症。然而, 抑制了炎症不能说明结肠组织得到功能性恢复。炎症性肠病伴随结肠黏膜层变薄, 结肠黏膜上皮损伤, 肠黏膜上皮细胞减少, 促进上皮细胞的修复也是治疗 UC 的关键。CK20 表达范围特异, 仅限于胃肠上皮, 因此可作为检测结肠黏膜上皮细胞的特征性指标^[9]。实验证实模型组、艾迪莎组、中药组 CK20 的表达高于正常组, 并且艾迪莎组和中药组 CK20 表达均高于模型组, 说明清热燥湿凉血方能有效促进结肠组织上皮的修复。另外, UC 愈合不良与受损结肠内皮屏障缺陷导致组织持续低灌注以及肠微血管功能障碍导致肠道缺血密切相关^[10]。损伤的结肠组织需要肉芽组织来修复, 沉积的结缔组织基质、成纤维细胞和血管生成成为结肠组织的修复提供氧气和营养^[11]。重建血管是溃疡或伤口愈合的关键, 是肉芽组织关键组成部分, 新生的毛细血管和大血管使纤维母细胞增生, 形成临时疏松肉芽组织^[12-13]。CD34 是一种高度糖基化跨膜蛋白, 主要存在于幼稚的造血干细胞和造血祖细胞质膜以及内皮细胞的祖细胞表面, 在内皮细胞胞浆中表达, 可作为内皮细胞的标志物^[14]。实验证实模型组、艾迪莎组、中药组 CD34 的表达高于正常组, 并且艾迪莎组和中药组 CD34 表达均高于模型组, 说明清热燥湿凉血方能有效促进结肠微血管生成, 从而促进结肠血液动力学的恢复, 使受损的黏膜组织微循环得以重建, 组织血氧供应增加, 从而促进结肠黏膜修复。

综上所述, 清热燥湿凉血方能有效抑制 UC 的炎症反应, 促进结肠黏膜上皮修复, 促进结肠微血管形成, 有效修复受损结肠组织。

参考文献

- [1] 梁丽, 范恒, 唐庆, 等. 复方苦参结肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎(湿热型) 40 例临床观察 [J]. 中西医结合研究, 2010, 2(1): 7-10.
- [2] 范恒, 寿折星, 吕建芳, 等. 复方苦参结肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎 11 例 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2007, 15(1): 60-61.
- [3] Han F, Lin S, Qing T, et al. Effect of Wumeiwan on Cytokines TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and Expression of NF- κ B p65 in Rats with Ulcerative Colitis [J]. J Huazhong Univ Sci Technol (Med Sci), 2009(5): 650-654.
- [4] 戎玲勤, 徐甦. 康复新液灌肠联合健脾清肠汤加减治疗溃疡性结肠炎 32 例 [J]. 中医杂志, 2013, 54(13): 1150-1151.
- [5] 隋华章, 萧峰, 王建立. 柴胡疏肝散合四神丸加减治疗溃疡性结肠炎合并抑郁症 40 例 [J]. 中医杂志, 2011, 52(7): 599-600.
- [6] 叶柏, 沈洪, 陆乐, 等. 清化活血敛瘀法治疗溃疡性结肠炎 100 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2008, 49(11): 986-988.
- [7] 范恒, 庄雄, 段雪云. 复方苦参结肠溶胶囊对溃疡性结肠炎患者结肠黏膜 I κ B- α 表达的作用 [J]. 中西医结合研究, 2009, 1(3): 113-116.
- [8] Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(33): 4145-4151.
- [9] 段江洁, 王蓓. 胎儿肠壁结缔组织诱导骨髓间充质干细胞向肠上皮细胞的分化 [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18): 1718-1721.
- [10] Deng X, Szabo S, Chen L, et al. New cell therapy using bone marrow-derived stem cells/endothelial progenitor cells to accelerate neovascularization in healing of experimental ulcerative colitis [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(16): 1643-1651.
- [11] Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection [J]. Gastroenterology, 2006, 131(1): 117-129.
- [12] Szabo S, Deng X, Tolstanova G, et al. Angiogenic and anti-angiogenic therapy for gastrointestinal ulcers: new challenges for rational therapeutic predictions and drug design [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(16): 1633-1642.
- [13] Danese S, Papa A, Scaldaferrì F, et al. A novel pathogenic role for microvasculature in inflammatory bowel disease [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2006, 10(1): 3-5.
- [14] Chamoto K, Gibney BC, Lee GS, et al. CD34⁺ progenitor to endothelial cell transition in post-pneumectomy angiogenesis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 46(3): 283-289.

Effects of Heat-Clearing Dampness-Drying Blood-Cooling Formula on the Repair in Colon Tissue of Rats with Ulcerative Colitis

ZHANG Xiameng¹, SHOU Zhexing², FAN Heng², SHI Yueping³

(1. The Second People's Hospital of Yichang, Hubei Province 443000; 2. Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science & Technology; 3. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of Heat-Clearing Dampness-Drying Blood-Cooling Formula (HDBF) for ulcerative colitis (UC). **Methods** Forty SD rats were randomized into the normal group, model group, Etiasa group and Chinese medicine group, with 10 in each. The rat models of UC were established in the model group, Etiasa group and Chinese medicine group. The normal group and model group were lavaged with normal saline once daily 24 hours later. The Etiasa group was lavaged with Etiasa and Chinese medicine group was lavaged with HDBF once daily 24 hours later. The lavation lasted for 15 days. The colon tissue specimens were observed. The expressions of CK20, CK20 mRNA, CD34, CD34 mRNA and nuclear factor- κ B (NF- κ B) mRNA were detected. **Results** The expressions of CK20, CK20 mRNA, CD34 and CD34 mRNA in the model group, Etiasa group and Chinese medicine group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.01$). The expressions of CK20, CK20 mRNA, CD34 and CD34 mRNA in the Etiasa group and Chinese medicine group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.01$). The expression of NF- κ B mRNA in the Etiasa group and Chinese medicine group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** HDBF can promote epithelial repair and angiogenesis in colon tissue of UC rats and inhibit the expression of NF- κ B, which may be one mechanism in treating UC.

Keywords Heat-Clearing Dampness-Drying Blood-Cooling Formula; ulcerative colitis; nuclear factor- κ B

(收稿日期: 2013-12-14; 修回日期: 2014-04-14)

[编辑: 邓媛]