

化浊解毒方对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜的保护作用

娄莹莹¹, 李佃贵¹, 霍永利¹, 贾宁², 徐伟超¹, 王亚敏³, 李燕⁴

(1. 河北省中医院脾胃病三科, 河北 石家庄 050017; 2. 唐山市血液中心, 河北 唐山 063000; 3. 河北沧州中西医结合医院, 河北 沧州 061012; 4. 河北中医学院研究生学院, 河北 石家庄 050091)

摘要: 目的 验证化浊解毒方对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜的保护作用。方法 将Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、美沙拉嗪组及化浊解毒方高、低剂量组, 每组10只, 2, 4, 6-三硝基苯磺酸/乙醇法建立溃疡性结肠炎大鼠动物模型, 造模成功后化浊解毒方高、低剂量组分别予41.6、20.8 g/kg化浊解毒方灌胃, 美沙拉嗪组给予0.3 g/kg美沙拉嗪灌胃, 模型组及正常组以蒸馏水10 mL/kg灌胃, 连续14 d, 观察各组大鼠疾病活动指数(DAI)评分、组织病理学、结肠上皮细胞Bax、caspase-9蛋白表达变化。结果 化浊解毒方可降低大鼠DAI评分, 改善结肠组织病理形态, 下调Bax、caspase-9蛋白表达, 以化浊解毒方高剂量组最明显, 与美沙拉嗪组效果相当。结论 化浊解毒方能下调溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞Bax、caspase-9蛋白表达, 进而抑制细胞过度凋亡, 恢复肠黏膜屏障功能, 进一步促进溃疡愈合。

关键词: 化浊解毒法; 溃疡性结肠炎; 肠黏膜

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)11-3199-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.052

溃疡性结肠炎属于炎症性肠病, 是一种原因、发病机制不完全明确的慢性非特异性肠道疾病。本病反复发作, 缠绵难愈, 已经成为公认的世界难题。随着我国疾病谱的变化, 我国溃疡性结肠炎的发病率逐年上升, 且成为结肠肿瘤的重要危险因素^[1]。越来越多的研究表明, 结肠上皮细胞的异常凋亡可能进一步影响肠黏膜的屏障功能, 肠黏膜被破坏或功能丧失, 从而导致溃疡性结肠炎发生^[2-3]。因此抑制结肠上皮细胞的过度凋亡, 使增殖与凋亡的动态平衡, 形成坚固的黏膜保护屏障, 是临床治疗溃疡性结肠炎的有效途径。国医大师李佃贵教授提出溃疡性结肠炎浊毒致病论, 并以化浊解毒法为基本治疗大法, 形成化浊解毒有效方剂, 前期研究表明, 该法可调节Th1/Th2平衡, 发挥抗炎作用。本实验从细胞凋亡角度验证化浊解毒法对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜的保护作用, 揭示其作用机制。

1 材料与方

1.1 药物 化浊解毒方由白头翁15 g、藿香12 g、黄连12 g、茵陈15 g、白花蛇舌草15 g、半枝莲12 g、当归12 g、芍药20 g、茯苓15 g、白术6 g、广木香9 g、秦皮15 g、地榆12 g、儿茶6 g、苦参9 g、仙鹤草15 g组成, 购于河北省中医院, 药材煎制并浓缩至所需浓度备用, 在4℃下保存, 低、高剂量分别相当于成人用量(3.33 g/kg)的6.25、12.5倍, 按20.8、41.6 g/kg给药。美沙拉嗪肠溶片(250 mg/片, 黑龙江葵花药业股份有限公司)研成细粉, 溶于蒸馏水, 配制成0.3 g/mL溶液。

1.2 动物 清洁级雄性Wistar大鼠50只, 体质量(220±20)g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号SCXK(冀)2018-008, 动物合格证编号1808139。

1.3 试剂 三硝基苯磺酸(美国Sigma公司); 兔抗大鼠Bax单克隆抗体(批号bs-0127R)、caspase-9单克隆抗体(批号bs-0049R)、羊抗兔SABC试剂盒、DAB显色试剂盒, 均购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 仪器 Olympus光学显微镜(日本Olympus公司); 离心机TDL-5-A(上海安亭科学仪器有限公司); 电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 电热恒温水箱600型(天津泰斯特仪器有限公司); 全自动洗板机(美国伯腾仪器有限公司)。

1.5 方法

1.5.1 分组 采用随机数字表将50只Wistar大鼠分成5组, 每组10只, 分别为正常对照组、模型组、美沙拉嗪组及化浊解毒方高、低剂量组。

1.5.2 建模 采用2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇法^[4], 将5%TNBS与50%乙醇等体积比例混合, 配置成含TNBS 25 mg/mL的混合液, 作为造模剂。大鼠禁食24 h后乙醚麻醉, 石蜡油将直径2 mm的硅胶管润滑, 插入倒置大鼠肠道约7~8 cm, 正常对照组大鼠给予生理盐水约0.8 mL, 造模大鼠给予造模剂, 剂量100 mg/kg(即4 mL/kg), 垂直倒置大鼠约30 s, 造模完毕恢复正常进食饮水。造模后第2天, 模型组、美沙拉嗪组、化浊解毒方高剂量组大鼠各死

收稿日期: 2020-02-24

基金项目: 国家中医药管理局重大疑难疾病(溃疡性结肠炎)中西医临床协作试点项目(国中医药办医政发[2018]3号); 河北省中医药管理局科研计划项目(2018030)

作者简介: 娄莹莹(1984—), 女, 博士, 副主任医师, 从事消化系统疾病的中西医结合研究。Tel: 15175150205, E-mail: yingzi135823@sina.com

亡1只。随机抽取造模大鼠2只，断头处死，发现结肠组织出现不同程度的充血水肿，有糜烂以及溃疡形成，提示本次实验造模成功^[5]。

1.5.3 给药 正常对照组、模型组大鼠给予10 mL/kg生理盐水，每天1次，连续14 d；化浊解毒方高、低剂量组给药剂量分别为41.6、20.8 g/kg，按照10 mL/kg剂量给药，每天1次，连续14 d；美沙拉嗪组给药剂量0.3 g/kg，连续14 d。

1.5.4 指标测定

1.5.4.1 疾病活动指数(DAI)评分 造模之日起，每天观察大鼠精神、毛发、体质量、粪便、饮食情况，并详细记录，参照Murano等^[6]制定的DAI评分标准进行评分。具体公式为DAI=(体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。

1.5.4.2 组织病理学变化 给药后所有大鼠断头处死，在严格无菌条件下取出结肠组织，固定24 h后制作石蜡切片，HE染色，在显微镜下观察各组大鼠结肠组织的情况。

1.5.4.3 结肠黏膜Bax、caspase-9蛋白表达 大鼠结肠组织切块，4%多聚甲醛固定，包埋切片，免疫组化检测Bax、caspase-9表达^[7]，石蜡切片，脱蜡脱水，3% H₂O₂室温孵育5~10 min，蒸馏水冲洗，PBS浸泡5 min，共2次，5%~10%正常山羊血清(PBS稀释)封闭，室温孵育10 min，滴加一抗工作液，37℃孵育1~2 h或4℃过夜，5 min PBS冲洗3次，二抗37℃孵育10~30 min，滴加适量辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液，37℃孵育10~30 min，显色剂显色3~15 min，冲洗、复染、脱水、透明、封片后在显微镜下观察。采用数码显微镜和图像采集系统观察并照相，光镜下阳性反应为黄到棕黄色颗粒，

主要定位于胞浆，亦可见于胞膜和核膜，应用Image pro-Plus 6.0图像分析软件测定其积分光密度。

1.5.5 统计学方法 采用SPSS 23.0软件进行数据处理，计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，2个独立样本均数比较采用*t*检验，多个独立样本均数比较采用单因素方差分析。*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠DAI评分 与模型组比较，各药物治疗组DAI评分均降低(*P*<0.05)；化浊解毒方高剂量组DAI评分比低剂量组低(*P*<0.05)；化浊解毒方高剂量组DAI评分与美沙拉嗪组比较，无明显变化(*P*>0.05)，见表1。

表1 各组大鼠DAI评分($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	DAI/分
正常对照组	10	—	0.00±0.00*
模型组	8	—	2.48±0.11
美沙拉嗪组	9	0.3	0.71±0.04*
化浊解毒方高剂量组	8	41.6	0.62±0.03*
化浊解毒方低剂量组	10	20.8	1.51±0.12*

注：与模型组比较，**P*<0.05。

2.2 大鼠结肠病理学变化 正常对照组大鼠结肠黏膜光滑，腺体结构完整，排列规则，无充血、水肿、糜烂或溃疡；模型组大鼠结肠黏膜充血、水肿明显，可见多发糜烂、溃疡灶形成，镜下腺体排列不规则、紊乱，杯状细胞减少，周围大量炎性细胞浸润；化浊解毒方高剂量组、美沙拉嗪组大鼠结肠黏膜基本光滑，充血、水肿减轻，溃疡较少并可见已愈合的溃疡面，腺体结构基本完整，炎性细胞也明显减少；化浊解毒方低剂量组大鼠结肠黏膜表面欠光滑，结肠组织轻度充血、水肿，可见少量糜烂、溃疡，腺体结构少量被破坏，部分边缘覆少量新生腺体，见图1。

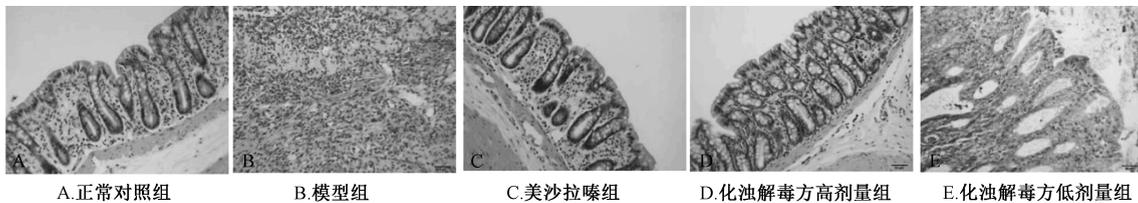


图1 各组小鼠结肠组织病理变化(×100)

2.3 对大鼠结肠上皮细胞Bax蛋白表达的影响 正常对照组大鼠结肠上皮细胞Bax呈弱阳性表达；与正常对照组比较，模型组大鼠结肠上皮细胞Bax蛋白的表达升高(*P*<0.05)；与模型组比较，化浊解毒方高低剂量组、美沙拉嗪组Bax蛋白表达降低(*P*<0.05)，见表2。

表2 各组大鼠结肠上皮细胞Bax蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	Bax
正常对照组	10	—	10 416.68±896.09*
模型组	8	—	19 012.86±901.32
美沙拉嗪组	9	0.3	13 012.26±912.34*
化浊解毒方高剂量组	8	41.6	12 186.37±867.78*
化浊解毒方低剂量组	10	20.8	16 492.18±946.75*

注：与模型组比较，**P*<0.05。

2.4 对大鼠结肠上皮细胞caspase 9表达的影响 与正常对照组比较，模型组大鼠结肠上皮细胞的caspase 9表达升高(*P*<0.05)；与模型组比较，化浊解毒方组、美沙拉嗪组caspase 9表达降低(*P*<0.05)，其中高剂量组低于低剂量组(*P*<0.05)，见表3。

表3 各组大鼠结肠上皮细胞caspase 9表达($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	caspase 9
正常对照组	10	—	8 648.32±686.35*
模型组	8	—	17 368.36±788.32
美沙拉嗪组	9	0.3	11 368.28±682.24*
化浊解毒方高剂量组	8	41.6	10 186.36±598.62*
化浊解毒方低剂量组	10	20.8	14 259.18±712.36*

注：与模型组比较，**P*<0.05。

3 讨论

溃疡性结肠炎以腹痛、腹泻、黏液脓血便为主要临床表现。溃疡性结肠炎的发病机制目前尚未完全明确，认为是感染、精神、遗传、免疫等多种因素综合作用的结果^[8]。同时研究表明，溃疡性结肠炎的发生与上皮细胞破坏和凋亡有着密切关系^[9-11]。细胞凋亡是一种重要的生物学过程，是在基因调控下所发生的一系列细胞主动死亡过程^[12]。当溃疡性结肠炎发生时，结肠上皮细胞增殖与凋亡平衡失调、凋亡过度，结肠上皮细胞和炎症细胞的失去协调作用，进而破坏上皮细胞屏障，引起物理性、化学性损伤，进而形成溃疡，如果上皮细胞脱落过快，溃疡将难以愈合^[11]。抑制结肠上皮细胞的过度凋亡，促进受损黏膜的修复、愈合是溃疡性结肠炎治疗思路。Bax 基因是人体最主要的凋亡基因，具有促进细胞凋亡的作用。Bax 促进细胞色素 C 释放到胞质，进而与 Apaf-1 及激活的 caspase-9 形成凋亡小体，从而激活 caspase-3 及后续线粒体凋亡途径，导致细胞凋亡^[13]。研究显示 caspase-9 在细胞过度表达，凋亡率明显增高^[14]。

对于溃疡性结肠炎病机认识，中医药治疗中提出“浊毒致病论”，认为是因饮食内伤、情志不舒，导致肝胃不和、胃气失和、通降失职、清阳不升、浊邪内停，日久则脾失健运，水湿不化，湿浊中阻，郁滞不通，蕴久化热，热壅血瘀而成毒，浊毒聚于肠腑，气血瘀滞，血败肉腐，伤及肠壁血络，则会出现黏液脓血便、腹泻、腹痛等^[15]。溃疡性结肠炎病机在于浊毒内蕴。化浊解毒方由白头翁汤、香连丸、当归芍药散等加减组合而成。结果显示，化浊解毒方可降低 UC 大鼠 DAI 评分，改善结肠组织病理形态。与空白组比较，模型组大鼠 Bax、caspase 9 蛋白的表达增高，经治疗后各药物治疗组 Bax、caspase 9 蛋白的表达均降低，其中化浊解毒方降低最为明显，与美沙拉嗪组效果相当。提示化浊解毒方治疗溃疡性结肠炎的作用机理可能是下调 Bax、caspase 9 蛋白的表达，抑制溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞的过度凋亡，促进损伤结肠黏膜的修复，进一步促进溃疡面的愈合。因此，化浊解毒法治疗溃疡性结肠炎具有广阔的应用前景，应进一步挖掘其维持肠黏膜屏障稳态的深层作用机制。

参考文献:

[1] Foersch S, Waldner M J, Neueath M F. Colitis and colorectal cancer[J]. *Dig Dis*, 2012, 30(5): 469-476.

[2] Peled J U, Hanash A M, Jenq R R. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD[J]. *Blood*, 2016, 128(20): 2395-2402.

[3] Blander M J. Death in the intestinal epithelium-basic biology and implications for inflammatory bowel disease[J]. *FEBS J*, 2016, 283(14): 2720-2730.

[4] 陈英群,董福轮,马贵同.三硝基苯磺酸诱导大鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J].*同济大学学报(医学版)*, 2006, 27(6): 31-33.

[5] 贺海辉,沈洪,朱宣宣,等.2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇法诱导建立溃疡性结肠炎大鼠模型[J].*中国老年学杂志*, 2015, 35(15): 4138-4140.

[6] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51-58.

[7] 惠毅,闫曙光,郑旭锐,等.肺肠合法对支气管哮喘大鼠肺组织 VIP、AQP3 表达的影响[J].*时珍国医国药*, 2019, 30(2): 295-298.

[8] 刘梦莹,王启之.TLR9/NF-κBp65 信号通路与溃疡性结肠炎[J].*胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(9): 1149-1151.

[9] 刘与进,范恒,刘星星.炎症性肠病与干细胞源性微囊泡的研究进展[J].*华中科技大学学报(医学版)*, 2017, 46(6): 709-714.

[10] 沈雁,王章流,郑华君,等.小檗碱对溃疡性结肠炎模型小鼠肠上皮细胞凋亡的影响[J].*浙江中西医结合杂志*, 2018, 28(12): 992-996; 984.

[11] 惠毅,闫曙光,王晓龙.乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J].*中华中医药学刊*, 2016, 34(1): 149-151.

[12] 陈津,张如松.细胞凋亡机制概述[J].*中华中医药学刊*, 2011, 29(4): 886-889.

[13] 孙吉凤,何海涛.黄芩素通过线粒体凋亡途径诱导体外培养喉癌细胞凋亡的机制[J].*中国老年学杂志*, 2018, 38(8): 1947-1951.

[14] 周雅茵,张丙宏,严彩霞,等.肠三叶因子对新生鼠坏死性小肠结肠炎模型 Caspase-9 表达的影响[J].*中华实用儿科临床杂志*, 2009, 24(19): 1490-1491.

[15] 张纨,孙建慧,李娅,等.国医大师李佃贵治疗溃疡性结肠炎经验[J].*中华中医药杂志*, 2019, 34(4): 1504-1506.