

0.213 ± 0.025、0.411 ± 0.054、0.289 ± 0.032 和 0.183 ± 0.015、0.281 ± 0.021、0.245 ± 0.018, 药物处理组与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ), 其中 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  菱角提取物引起 Caspase-3、9 的活化程度最高。

### 3 讨论

菱角是我国南北均有分布的药用植物, 在民间广泛用于治疗肝腹水、肝癌等, 是对肿瘤有治疗和辅助治疗作用的药物。前期研究表明菱角提取物含有 3, 4, 5-三羟基苯甲酸在内的多种活性物质, 对肿瘤细胞具有较强的抑制作用。本实验表明菱角提取物能抑制 HL-60 细胞增殖, 并呈量效和时效关系。通过对 HL-60 细胞的形态学观察, 发现细胞在不同浓度的菱角提取物作用下表现出一系列凋亡形态特征变化, 如细胞核固缩、边缘化、凋亡小体形成等, 结合 DNA 电泳呈现的典型梯状条带, 表明菱角提取物能诱导 HL-60 细胞凋亡。通过流式细胞仪定量显示细胞凋亡率。通过流式细胞仪定量显示细胞凋亡率, 菱角提取物在 25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度下诱导 HL-60 细胞凋亡呈浓度依赖性, 凋亡率分别为 (7.54 ± 0.98)%、(16.25 ± 3.13)% 和 (27.56 ± 4.87)%。

细胞凋亡是由基因调控的细胞主动死亡过程, 线粒体依赖性细胞凋亡通路是抗肿瘤药的诱导细胞凋亡的核心通路<sup>[4]</sup>。在凋亡诱导信号的作用下, 线粒体膜通透性转运通道 (mitochondrial membrane permeability transition pore, MMPT) 开放, 或者线粒体肿胀, 导致线粒体膜电位下降, 释放的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 和 Caspase-9 形成复合体, 激活 Caspase 级联反应, 导致细胞凋亡<sup>[5]</sup>。

Hengartner 等<sup>[6]</sup> 研究认为线粒体膜电位的丧失是诱导细胞凋亡的重要途径。本研究结果表明: 菱角提取物作用 HL-60 细胞 48 h 后, 弱荧光细胞明显增多, 呈剂量依赖性。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  菱角提取物作用 48 h 弱荧光细胞比率达到 (85.25 ± 10.6)%, 提示线粒体功能已经严重受损。Caspase-9 是线粒体凋亡途径的关键蛋白酶, 处于 Caspase “瀑布式” 激活的顶端; Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者, 通过特异性地裂解一套底物而导致细胞凋亡。实验结果表明, 不同浓度菱角提取物作用 48 h, Caspases-9、3 蛋白活性显著增加。

综上所述, 菱角提取物可诱导 HL-60 细胞凋亡, 其在诱导细胞凋亡过程中细胞线粒体膜电位下降, 并激活 Caspase-9、3。这些结果表明菱角提取物可能通过线粒体信号传导通路诱导 HL-60 细胞凋亡。但是, 由于细胞凋亡是一个多系统参与、多阶段的复杂生化反应, 菱角提取物诱导肿瘤细胞凋亡的机制有待于进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Niu F L, Wang X D, Wang Y L, et al. Trihydroxybenzoic acid dimer-induced apoptosis effect *in vitro* [J]. *Chem Res Chin U.*, 2005, 21(4): 463-467.
- [2] 吴国东, 周惠君. 青蒿琥酯诱导人脐静脉内皮细胞凋亡 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(4): 294-299.
- [3] 唐旭东, 周克元, 侯 敢, 等. 白藜芦醇诱导鼻咽癌细胞 CNE-2Z 凋亡的线粒体机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(3): 171-177.
- [4] Gottlieb R A. Mitochondrial execution central [J]. *Febs Let*, 2000, 482(1-2): 6-12.
- [5] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death [J]. *Science*, 1998, 282(5381): 1317-1322.
- [6] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407(12): 770-776.

## 藿香正气提取物对腹泻型肠易激综合征大鼠免疫功能的调节作用

李 丹, 吕 妍, 唐 方\*

(天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

**摘要:** 目的 研究藿香正气提取物调节腹泻型肠易激综合征 (IBS) 大鼠免疫功能机制。方法 30 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组: 对照组、模型组和藿香正气提取物组, 对照组未作任何处理, 余两组采用番泻叶水煎剂 ig 给药联合肢体束缚应激的方法制备 IBS 模型。模型组大鼠给予高压灭菌蒸馏水, 藿香正气提取物组 ig 给予藿香正气提取物, 连续 6 d。通过放免法和酶联免疫吸附法测定各组大鼠 P 物质 (SP)、白细胞介素- $\beta$  (IL- $\beta$ )、IL-2 的水平。结果 模型组大鼠胸腺、脾脏指数、IL-2 水平下降, IL- $\beta$ 、SP 水平显著升高, 与对照组相比具有统计学差异 ( $P <$

\* 收稿日期: 2008-11-20

作者简介: 李 丹, 硕士。E-mail: ech012\_22@163.com

0.05); 藿香正气提取物可改善模型大鼠的胸腺、脾脏指数, 调节 IL-1 $\beta$ 、IL-2 和 SP 水平, 与模型组相比较具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。结论 IBS 模型大鼠存在免疫器官萎缩, SP、IL-1 $\beta$  水平升高, IL-2 水平降低的病理状态, 藿香正气提取物可调控模型大鼠紊乱的激素水平, 达到调节免疫功能的治疗目的。

关键词: 藿香正气提取物; 腹泻型肠易激综合征; 免疫功能

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)03-0440-03

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 为消化道最常见的功能性疾病之一, 其主要症状为腹部不适和 (或) 疼痛及慢性间歇性排便习惯和大便性状的改变, 有时伴随机体其他各系统变化多样的一系列症状, 而缺乏形态学和生化学的异常改变。IBS 的病因至今尚未完全明了, 可能与心理、精神、感染等因素有关。部分 IBS 患者肠黏膜中炎症介质的表达增高<sup>[1]</sup>。尽管 IBS 并不被人们认为是一种炎症性疾病, 但常常可以在 IBS 患者的结肠黏膜组织学研究发现一些中度非特异性炎症改变<sup>[2]</sup>。为了研究藿香正气对 IBS 的治疗作用并探讨其作用机制, 本研究复制 IBS 大鼠模型, 观察藿香正气提取物对大鼠免疫器官指数、免疫因子的影响, 探讨其调节免疫功能的作用机制, 为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

1.1 动物: 清洁级 Wistar 大鼠 30 只, 平均体质量 (160  $\pm$  10) g, 雌性, 购于军事医学科学院实验动物中心, 许可证号 SSXK-(军) 2002-001。实验大鼠适应性平衡饲养 3 d 后用于实验。

1.2 药物: 藿香正气提取物, 由中新药业天津达仁堂制药厂提供, 质量浓度为 53.6 mg/mL; 番泻叶水煎剂, 由天津医科大学总医院中药房提供, 质量浓度为 0.2 g/mL。

1.3 主要试剂和仪器: 大鼠白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 酶联免疫吸附测试盒、大鼠 IL-2 酶联免疫吸附测试盒, 美国 ADL 公司; P 物质 (SP) 放免试剂盒, 北京普尔伟业生物科技有限公司。放射免疫  $\gamma$  计数器, 中国科大中佳公司; KHB, ST-360 酶标仪, 上海科学实验仪器有限公司; TL-18M 台式高速冷冻离心机, 上海; 恒温振荡水浴箱, 上海; 电子天平, 日本。

## 2 方法

2.1 动物分组及模型建立: 大鼠随机分为对照组、模型组、藿香正气提取物组, 每组 10 只。模型建立参照文献方法<sup>[3,4]</sup>略做改变, 模型组、藿香正气组动物分别 ig 予以 0.2 g/mL 番泻叶煎剂 (参照前期实验结果按 1 mL/100 g), 1 次/d, ig 完番泻叶煎剂 1 h 后, 使用统一拉力强度橡皮筋 (300 g, 相当环绕 5 圈), 将大鼠四肢末端固定于 18 cm  $\times$  25 cm 的木板

上, 直立放置, 使之不能活动, 烦躁不安, 造成一定应激刺激, 持续 2 h, 连续 6 d。

2.2 各组用药: 对照组和模型组每日予以高压灭菌消毒饮用水 ig 1 mL/100 g, 藿香正气组于束缚应激结束后 ig 给予 536 mg/kg 藿香正气提取物溶液, 1 次/d, 连续 6 d。

## 2.3 检测指标

2.3.1 脏器指数的测定: 剖开胸腹腔, 摘取胸腺、脾脏, 滤纸拭去血迹, 电子天平称质量, 计算胸腺指数和脾脏指数。

2.3.2 血清和结肠黏膜匀浆制备: 腹主动脉取血 2 mL, 静置 3~4 h, 4  $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。-20  $^{\circ}$ C 保存待测。剖开腹腔摘取近端结肠组织 100 mg, 纵行剖开, 4  $^{\circ}$ C 生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 尽快加入 1 mL 生理盐水碾磨, 制成 10% 的组织匀浆, 4  $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min, 弃去沉淀, 取上清液, -20  $^{\circ}$ C 保存待测。

2.3.3 SP、IL-1 $\beta$ 、IL-2 测定: 严格按照试剂盒说明书操作测定。

2.4 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用方差分析。

## 3 结果

3.1 各组脏器指数比较: 大鼠造模后性情改变, 急躁易怒; 毛色失去光亮, 晦暗无光泽, 鼠毛竖起易脱落, 与对照组比较, 脾脏指数下降 ( $P < 0.05$ ), 胸腺明显萎缩 ( $P < 0.01$ ); 藿香正气组大鼠性情较温和, 脾脏指数、胸腺指数均接近正常水平 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组脏器指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1 Comparison of organ index among groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	脾脏指数/%	胸腺指数/%
对照	0.33 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.03
模型	0.27 $\pm$ 0.06*	0.15 $\pm$ 0.02**
藿香正气	0.32 $\pm$ 0.03 $\Delta$	0.22 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

与模型组比较:  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs control group

$\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$  vs model group

3.2 各组 IL-1 $\beta$  水平比较: 模型组血清 IL-1 $\beta$  水平显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 藿香正气提取物可以有效降低升高的 IL-1 $\beta$  水平 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

3.3 各组 IL-2 水平比较: 如表 2 所示, 模型组大鼠血清中 IL-2 水平低于对照组, 具有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ ); 藿香正气提取物可有效改善 IL-2 水平 ( $P < 0.01$ )。

3.4 各组 SP 水平比较: 模型组结肠匀浆 SP 水平较对照组显著升高 ( $P < 0.01$ ); 藿香正气提取物可改善高水平的 SP, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-2 水平和结肠匀浆中 SP 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 2 Comparison of IL-1 $\beta$  and IL-2 level in serum and SP level in colon homogenate of rats among groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	IL-1 $\beta$ /(ng·mL <sup>-1</sup> )	IL-2/(ng·mL <sup>-1</sup> )	SP/(pg·mL <sup>-1</sup> )
对照	196.80 ± 22.48	733.87 ± 119.25	367.61 ± 81.76
模型	228.08 ± 25.02**	585.37 ± 69.51**	930.57 ± 111.85**
藿香正气	203.28 ± 20.34 $\Delta$	649.95 ± 104.58	504.26 ± 21.06 $\Delta$

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $\Delta P < 0.05$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs model group

#### 4 讨论

IBS 的患病率为女性大于男性, 雌激素及其受体在 IBS 的发病过程中起着重要的作用。因此为了更能贴近人类 IBS 发病特点, 本实验选取成年雌性大鼠为研究对象, 并对文献报道的模型制备方法进行改良, 降低致泻因素的作用, 加大应激强度, 突出精神因素的作用。鉴于较长的实验周期中高强度的应激会造成大鼠应激性溃疡等病理性改变, 有悖于 IBS 无明显器质性改变的特点, 故缩短造模时间。

尽管 IBS 并不被人们认为是一种炎症性疾病, 但常常可以在 IBS 患者的结肠黏膜组织学研究中发现一些轻中度非特异性炎症改变<sup>[2,5]</sup>, 提示 IBS 与免疫功能紊乱有关系。可能与神经内分泌系统紊乱加重脑-肠轴对胃肠功能调节失衡, 从而影响神经免疫通路有关<sup>[6]</sup>。胸腺和脾脏是重要的免疫器官, 不但可以产生 T、B 细胞, 还是进行免疫活动的重要场所。本实验结果显示 IBS 大鼠存在免疫功能低下的表现, 提示应激能够抑制机体免疫功能, 与文献报道<sup>[7]</sup>相符。IL-1 $\beta$  是单核巨噬细胞合成与分泌的一种多肽, 可在中枢内通过不同环节对免疫系统功能起重要调节作用, 是神经系统与免疫系统之间的一种重要的中介物质, 可以诱发炎症反应。本实验

中模型组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  水平较对照组显著升高, 与国内学者研究结果一致<sup>[8]</sup>。推测高水平的 IL-1 $\beta$  在 IBS 动物模型轻微炎症发生发展过程中起到重要的促进作用。IL-2 是由 TH1 细胞和巨噬细胞分泌的, 具有调节机体免疫、增加机体抗感染的能力, 在应激状态下促进 NK 细胞的杀伤力, 提高免疫应激能力, 在一定程度上介导炎症细胞的浸润、趋化及吞噬作用, 促进修复细胞的增殖分化, 产生免疫效应<sup>[9]</sup>。本实验应用番泻叶 ig 联合肢体束缚应激的方法制备 IBS 模型, 结果显示模型组血清中 IL-2 水平明显低于对照组。SP 广泛分布于神经系统和胃肠系统的肠肌间神经丛和黏膜下神经丛, 能够以神经分泌的方法作用于各种免疫细胞, 参与免疫调节促进免疫功能。本实验中, 模型组大鼠表现的肠道低水平炎症以及黏液分泌增多, 可能与其结肠组织中较高的 SP 水平密切相关。用药后, SP 水平降低, 提示藿香正气提取物可能通过降低 SP 水平, 发挥其对 IBS 大鼠的免疫调节作用。

本研究结果显示芳香醒脾代表方藿香正气能有效抑制模型大鼠免疫器官的萎缩, 提高脏器指数, 抑制外周促炎因子 IL-1 $\beta$ 、SP 水平, 提高抑炎因子 IL-2 的量, 调节促炎与抑炎因子平衡, 从而发挥其对免疫功能的调节作用。

#### 参考文献:

- [1] Neal K R, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients [J]. *BMJ*, 1997, 314: 779-782
- [2] Gwee K A, Collins S M, Marshall J S, et al. Evidence of inflammatory pathogenesis in postinfectious irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114: A930
- [3] 徐海珍, 谢建群. 腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜炎性细胞因子的表达及温中健脾方对其影响的研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2007, 41(6): 69-72
- [4] 李冬华, 李春森, 李伍善, 等. 腹泻型肠易激综合征模型大鼠血管活性肠肽的影响 [J]. *时珍国医药*, 2007, 18(9): 2098-2099
- [5] Chadwick V S, Chen W, Shu D, et al. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122: 1778-1783
- [6] 金杭斌. 神经-免疫-内分泌网络与肠易激综合征 [J]. *国际消化病杂志*, 2006, 26(1): 40-43
- [7] 鲁洪, 宋德懋, 冯娟, 等. 束缚应激上调小鼠脾脏淋巴细胞钾离子通道 (Kv1.3) 的表达 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2006, 13(2): 113-116
- [8] 陈浩, 柯美云. 肠易激综合征与炎症关系的研究现状 [J]. *国际消化病杂志*, 2007, 27(3): 172-177
- [9] 罗慈伟, 卓蕴雄, 欧阳可鉴. 脑外伤 SIRS 患者外周血中 IL-2, IL-6 的临床观察 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2006, 11(1): 34-35