

氧化形式 ($2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$), 由此能清除 H_2O_2 。本实验观察了山楂叶抽提物对 HUVEC 中 GSH-Px 活性的影响。结果显示, 在 H_2O_2 处理 HUVEC 后, 加入富含黄酮的山楂叶抽提物可以促进 GSH-Px 的活性, 表明山楂叶抽提物可通过调控 GSH-Px 活性, 清除 HUVEC 中的 H_2O_2 。

在本实验结果中, 富含黄酮的山楂叶总抽提物可剂量依赖性地降低 H_2O_2 预处理的 HUVEC 中的 H_2O_2 含量。然而, 此抽提物激活 HUVEC 的 GSH-Px 活性却是以非剂量依赖方式。这些结果提示: 富含黄酮的山楂叶总抽提物可能还通过其他途径降低 HUVEC 中的 H_2O_2 含量。本实验还应用流式细胞术, 研究了山楂叶抽提物对 H_2O_2 所致细胞毒的抑制作用。结果显示, 富含黄酮的山楂叶抽提物可以抑制

H_2O_2 所致 HUVEC 的损伤, 提示此抽提物可通过清除 HUVEC 中过量 H_2O_2 而引起细胞保护作用。

References:

- [1] Chatterjee S S, Koch E, Jaggy H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* investigations on the cardio-protective effects of oligomeric procyanidins in a *Crataegus* extract from leaves and flowers [J]. *Arzneimittel-Forsch*, 1997, 47: 821-825.
- [2] Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745.
- [3] Harlaw E, Lane D. *Using Antibody: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1999.
- [4] Diana A. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage [J]. *Mutat Res*, 1996, 350: 103-108.
- [5] Hitomi S, Yoichi T, Mitsuko S, *et al.* Effect of vitamin E on the degradation of hydrogen peroxide in cultured human umbilical vein endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2000, 68: 353-359.

八味锡类散不同途径给药治疗大鼠溃疡性结肠炎的药效对比研究

刘端勇^{1,2}, 赵海梅², 赵宁³, 赵林华³, 贾红伟³, 肖诚³, 吕诚³, 赵红艳³, 何颖辉², 辛增平², 吕爱平^{1,3*}

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006;

3. 中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

八味锡类散具有清热解暑、消肿止痛之功。常用于内有蕴热、外感时邪引起的瘟疫白喉、咽喉肿痛及溃疡性结肠炎 (UC) 等的治疗, 用于治疗 UC 时常用的方法是 *po* 和灌肠, 但究其两种不同途径给药治疗 UC 的疗效和作用机制对比分析鲜见报道, 本实验即从此角度出发, 对二者进行对比实验研究。

1 材料与方法

1.1 动物及分组: 新西兰家兔 8 只 (中国药品生物制品检定所实验动物中心)。清洁级健康 SD 大鼠 72 只 (北京大学医学部实验动物科学部), 雌雄各半, 体重 (160 ± 10) g, 随机分成正常组、灌胃模型组 (模型 I 组)、灌肠模型组 (模型 II 组)、八味锡类散灌胃治疗组 (治疗 I 组)、八味锡类散灌肠治疗组 (治疗 II 组)、柳氮磺吡啶组 (阳性对照组), 每组 12 只, 常规饲养 3 d 后使用。

1.2 主要药物及试剂: 八味锡类散每支 1 g (北京同仁堂股份有限公司, 批号 4100008); 柳氮磺吡啶, 每片 0.25 g (上海三维制药有限公司, 批号

200403C09); 盐酸氯胺酮注射液 (上海第一生化药业有限公司, 批号 951020); CD4、CD8 单克隆抗体 (BD Biosciences 公司产品); CD4、CD8 免疫组化试剂盒 (SANTA 公司产品); 完全弗氏佐剂 (Sigma 公司产品); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司产品)。

1.3 仪器: Leica 图像分析仪和 Qwin100 图像分析处理系统 (德国 Leica 公司); EPICS (XL) 流式细胞仪 (美国 Coulter 公司); SABA 全自动生化仪 (意大利 SABA 公司)。

1.4 造模方法: 按文献方法进行^[1]。抗原乳化液的制备: 取家兔分离结肠黏膜, 加适量生理盐水置组织捣碎机中捣碎, 于 -20°C 下保存 24 h 后, 溶冻, 再以 4 000 r/min 离心 30 min, 取其上清液即抗原原液并测得其蛋白质质量浓度 (14.5 g/L)。取抗原原液与等量完全弗氏佐剂混匀为 10 mg/mL 溶液, 然后用注射器反复抽吸、充分乳化, 制成抗原乳化液。大鼠致敏与处理方法: 除正常组外, 其他各组大鼠均予

收稿日期: 2004-05-11

基金项目: 江西省企业创新基金 (2003-239)

作者简介: 刘端勇, 男, 江西中医学院国家工程研究中心 2002 级方剂专业硕士研究生。

* 通讯作者 Fax: (010) 64013896 Tel: (010) 64067611 E-mail: lap@jzjt.com

造模。于大鼠足跖部及腹腔内注射抗原乳化液 1.2 mL (含抗原原液蛋白 8 mg), 常规饲养后第 8 天, 再于大鼠背部皮下及腹腔内注射抗原原液 (不加完全弗氏佐剂) 0.6 mL (含抗原原液蛋白 8 mg), 于第 14 天用氯胺酮 2 mL/kg im 麻醉, 2% 福尔马林 2 mL 保留灌肠 1 h, 后用生理盐水冲洗, 再用抗原原液 0.6 mL 灌肠留置 2 h, 生理盐水冲洗。

1.5 给药方法: 自造模后第 1 天起, 换体表面积换算, 八味锡类散灌胃治疗组和灌肠治疗组大鼠分别 ig、灌肠给予 0.1 g (0.1 g/mL) 八味锡类散, 阳性对照组动物灌肠给予柳氮磺吡啶 100 mg (100 mg/mL), 每日 1 次, 共 18 d。灌胃模型组和灌肠模型组动物分别 ig、灌肠给予等体积生理盐水, 正常组动物灌肠给予等体积生理盐水。

1.6 处理及观察: 给药 18 d 后, 摘眼球取血, 脱颈椎处死大鼠, 迅速自肛门 2 cm 处向上分离结肠 6~8 cm, 沿肠系膜纵轴剪开, 用生理盐水冲洗干净, 并将肠黏膜向上平铺于蜡板上固定, 观察炎症及溃疡发生情况; 根据炎症损伤程度进行结肠组织损伤评分。评分标准^[2]: 无损伤 0 分; 黏膜充血、水肿、未出现溃疡为 1 分; 黏膜充血、水肿、轻度糜烂、无溃疡为 2 分; 黏膜充血、水肿、中度糜烂、有单个溃疡为 3 分; 黏膜充血、水肿、高度糜烂、有多处溃疡为 4 分; 黏膜充血、水肿、重度糜烂、有 1 cm 以上溃疡为 5 分。剪取部分结肠组织, 10% 福尔马林溶液固定, 病理切片, HE 染色, 光镜下观察溃疡生成情况; 部分结肠组织迅速于液氮中保存, 待用于免疫组化测定 CD4、CD8 及 TNF- α 的表达。

1.7 流式细胞术测定 CD4、CD8 T 淋巴细胞水平: 大鼠眼球取血, 加肝素抗凝, 分别取血 50 μ L 与 5 μ L CD4 单克隆抗体和 5 μ L CD8 单克隆抗体的 2 个离心管中振匀, 4 $^{\circ}$ C 下保存 30 min; 加入适量红细胞溶解液, 1 000 r/min 离心 1.5 min, 弃其上清液; 加入适量生理盐水以 1 000 r/min 离心 1.5 min, 反复几次, 以试管底部不见红色为度, 滤过后上流式细胞仪检测。

1.8 免疫组织化学检测: 将液氮中保存的组织冰冻切片, 按照说明书进行免疫组化分析。

1.9 统计学方法: 采用 SPSS11.5 软件进行统计学处理, 血细胞和免疫组织化学结果采用方差分析, 病理组织记分采用秩和检验。

2 结果

2.1 病理形态学观察及结肠组织损伤评分: 普通光镜下可见模型组浆膜充血、水肿、淋巴细胞浸润、血

管壁增厚, 肠黏膜剥脱, 形成较大且数量较多的溃疡, 黏膜肌层破坏, 可见黏膜糜烂, 组织坏死。各治疗组溃疡数及面积较模型组减小, 糜烂、炎症细胞浸润程度减轻, 尤以灌肠治疗组及阳性对照组明显, 除上述症状缓解外, 灌肠治疗组动物还可见溃疡底部黏膜下层有纤维结缔组织增生, 伴少量炎症细胞浸润, 轻度水肿。正常组、模型 I 组、模型 II 组、治疗 I 组、治疗 II 组、阳性对照组结肠组织损伤评分分别为 0.2 ± 0.8 、 2.8 ± 0.8 、 1.8 ± 1.2 、 0.9 ± 0.7 、 0.6 ± 0.8 分, 两模型组评分均较正常组显著偏高 ($P < 0.01$); 各治疗组较模型组明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01); 治疗 II 组动物结肠组织评分低于治疗 I 组 ($P < 0.05$), 与阳性对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$); 治疗 I 组损伤评分高于阳性对照组 ($P < 0.01$), 提示八味锡类散灌肠给药治疗效果与柳氮磺吡啶相似, 且优于八味锡类散灌胃给药治疗效果。

2.2 流式细胞术测定外周血中 CD4、CD8 T 淋巴细胞水平: 见表 1。两模型组 CD4 T 淋巴细胞水平较正常组明显升高 ($P < 0.01$), 各治疗组与模型组比较有下降趋势, 但差异无显著性; 模型组 CD8 T 淋巴细胞水平较正常组显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 治疗组较模型组有升高趋势, 但差异均无显著性; 治疗 II 组升高作用比治疗 I 组明显 ($P < 0.05$), 且与阳性对照组比较, 差异不显著。两模型组 CD4/CD8 较正常组显著升高 ($P < 0.01$); 治疗 II 组及阳性对照组较模型 II 组下降, 且差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 但治疗 I 组与两模型组比较差异不显著; 治疗 II 组较治疗 I 组明显下降 ($P < 0.01$); 治疗 I 组高于阳性对照组, 且有极显著意义 ($P < 0.01$); 治疗 II 组与阳性对照组差异不显著。实验结果表明两个

表 1 大鼠外周血 CD4、CD8 T 淋巴细胞比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 1 Comparison between CD4 and CD8 T lymphocytes in peripheral blood of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组 别	CD4/%	CD8/%	CD4/CD8
正常	31.8 ± 6.1	21.6 ± 5.5	1.6 ± 0.4
模型 I	$42.3 \pm 7.8^{**}$	$16.4 \pm 4.2^{*}$	$2.7 \pm 0.5^{**}$
模型 II	$44.3 \pm 10.2^{**}$	$14.7 \pm 3.7^{**}$	$3.2 \pm 1.0^{**}$
治疗 I	39.0 ± 9.4	$12.9 \pm 3.6^{*}$	$3.1 \pm 0.7^{**}$
治疗 II	37.7 ± 7.5	$16.9 \pm 4.0^{\Delta}$	$2.3 \pm 0.5^{\Delta\Delta}$
阳性对照	38.6 ± 6.2	16.2 ± 4.1	$2.4 \pm 0.5^{**}$

与正常组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与阳性对照组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与治疗 I 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$

$^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与模型 II 组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs normal group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs positive control group; $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs treatment group I; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group II

模型组存在 CD4、CD8 T 淋巴细胞异常,八味锡类散和柳氮磺吡啶对 T 淋巴细胞均有调节作用,灌肠给药效果较灌胃给药明显,且与柳氮磺吡啶类似。

2.3 各组大鼠结肠黏膜免疫组化检测结果

2.3.1 CD4、CD8 淋巴细胞免疫组化结果:光镜下计算棕黄色阳性细胞个数,见表 2。CD4 淋巴细胞水平两模型组较正常组下降,且差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01),各治疗组与模型组比较差异无显著性,但治疗Ⅱ组较治疗Ⅰ组明显升高 ($P<0.01$);CD8 淋巴细胞水平两模型组较正常组显著升高 ($P<0.05$),治疗Ⅱ组、阳性对照组较模型组显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),治疗Ⅱ组较治疗Ⅰ组下降明显 ($P<0.05$),与阳性对照组比较,治疗Ⅰ组差异显著 ($P<0.01$),但治疗Ⅱ组则不显著。结果表明八味锡类散灌肠给药在调节 CD4、CD8 淋巴细胞水平方面,效果好于灌胃给药,且与柳氮磺吡啶作用相似。

2.3.2 TNF- α 免疫组化结果:光镜下计算棕黄色阳性细胞面积与所取区域面积比值,见表 2。两模型组较正常组升高,各治疗组均降低,与模型组比较差异显著 ($P<0.01$),治疗Ⅱ组下降和较治疗Ⅰ组明显 ($P<0.05$),而治疗Ⅰ组高于阳性对照组 ($P<0.01$),治疗Ⅱ组与阳性对照组则差异不显著,说明八味锡类散灌肠给药在调节 TNF- α 水平上优于灌胃给药,且与柳氮磺吡啶作用相似。

3 讨论

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是以腹痛、腹泻、黏液脓血便和里急后重为主要症状的消化道疾病。其主要的病理变化可见结肠黏膜慢性持续

性炎症改变和溃疡形成。在本实验中模型组大鼠可见浆膜充血、水肿、淋巴细胞浸润、血管壁增厚,肠黏膜剥脱,形成较大且数量较多的溃疡,黏膜糜烂,组织坏死;各治疗组溃疡数减少,炎症细胞浸润的程度减轻,溃疡底部有不同程度的纤维结缔组织增生,黏膜修复,组织损伤评分亦较模型组有显著改善,表明八味锡类散能有效的减轻 UC 的病理损伤。

UC 发病机制尚未明确,常认为是由于抗原的刺激和体内免疫系统的激活而引起结肠慢性炎症,其黏膜免疫系统被破坏,重要的特征就是肠道免疫细胞的浸润。转基因敲除鼠的动物模型实验证明,CD4 淋巴细胞是结肠炎的致病性 T 细胞,是通过 Th1 或 Th2 通路引发肠道炎症的^[3]。在本实验中,模型组大鼠外周血中的 CD4 淋巴细胞水平明显偏高,CD4 淋巴细胞可以促进 TNF- α 、白细胞介素-2 (IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ) 等细胞因子的分泌,介导细胞免疫,并活化 B 细胞,产生中和抗体和 IgE 引发炎症^[4]。Neurath 认为,CD4 淋巴细胞有助于肠道炎症的启动和维持^[5]。同时在结肠黏膜上 CD8 淋巴细胞显著增加,直接参与炎症反应并在一定程度上抑制了 CD4 淋巴细胞活性,引起局部炎症反应或直接损伤组织细胞,进而引发自身免疫性疾病。而 TNF- α 作为由单核巨噬细胞和活化的 T 淋巴细胞分泌的一种重要的促炎症因子和免疫调节因子,在 UC 的发病机制中起了重要作用。在诸多因素的刺激下,TNF- α 的激活,可活化 T 细胞并促其表达主要组织相容性抗原 I 和 II,活化 B 淋巴细胞,分泌 IL-1、IFN- γ 、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等细胞因子,同时提高单核细胞及巨噬细胞杀伤力和抗原递呈能力、增强中性粒细胞的吞噬功能和淋巴因子-激活杀伤细胞 (LAK) 活性及黏附因子的表达,促使中性粒细胞、淋巴细胞、单核粒细胞黏附到内皮细胞上,促进免疫应答,造成组织炎症和损伤^[6]。所以 TNF- α 被公认为介导 UC 的细胞因子,诸多报道均显示 UC 中 TNF- α 分泌水平及其 mRNA 表达高于正常组或未受累结肠黏膜^[7]。本实验中模型组大鼠 TNF- α 水平明显高于正常组,与文献报道相符。

八味锡类散由青黛、牛黄、珍珠、西瓜霜、冰片等组成,具有清热解毒、消肿止痛之功。其组成药物有抗菌、消肿、止痛、促进组织修复等药理作用。实验证明青黛可促进 T 淋巴细胞的成熟及活性的提高^[8],说明其对提高细胞免疫功能有一定的疗效。本实验

表 2 大鼠结肠黏膜 CD4、CD8 淋巴细胞及 TNF- α 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 2 Comparison on CD4, CD8 lymphocytes and TNF- α level in colonic mucosa in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组 别	CD4	CD8	TNF- α
正常	30.5 $\pm$ 4.3	19.4 $\pm$ 5.2	0.027 $\pm$ 0.003
模型Ⅰ	22.7 $\pm$ 5.5*	26.1 $\pm$ 4.2*	0.034 $\pm$ 0.003**
模型Ⅱ	22.0 $\pm$ 3.6**	28.1 $\pm$ 6.9**	0.040 $\pm$ 0.007**
治疗Ⅰ	20.2 $\pm$ 3.5	25.4 $\pm$ 4.3**	0.019 $\pm$ 0.002***
治疗Ⅱ	26.7 $\pm$ 4.4 $\Delta\Delta$	19.6 $\pm$ 5.1 Δ	0.016 $\pm$ 0.003*** Δ
阳性对照	24.1 $\pm$ 3.1	18.3 $\pm$ 4.0**	0.013 $\pm$ 0.002**

与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与治疗Ⅰ组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型Ⅰ组和模型Ⅱ组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与阳性对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group; $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs treatment group I; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group I and model group II; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs positive control group

次平行试验,橙皮苷的含量 RSD 为 1.76%。

2.7 加样回收率试验:精密称取已知橙皮苷含量的河北安国购蜘蛛香样品粉末 1.5 g 3 份,准确加入橙皮苷对照品适量,依法测定,计算回收率。结果平均回收率为 99.87%,RSD=1.87%。

2.8 样品的测定:精密称取 7 种不同产地收集的蜘蛛香样品各 1.5 g,分别置于 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,超声提取 0.5 h,提取液浓缩后定容至 5 mL,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,吸取 5 μ L 进样测定,结果见表 1 和图 1。

表 1 不同产地、时间收集的蜘蛛香样品的
橙皮苷含量 (n=5)

Table 1 Hesperidin content of *V. jatamansi* collected
from different habitats in different times (n=5)

购入及采集地	时间	橙皮苷/%	RSD/%
河北安国	2002-07	0.974 9	2.32
四川成都	2002. 07	0.967 2	1.37
贵州贵阳	2002-07	1.231 1	2.27
四川雅安	2002-07	0.447 3	1.53
陕西咸阳	2002-07	0.520 6	2.41
云南昆明	2002-07	0.645 1	2.93
四川峨眉山	2002-07	0.367 6	3.19

3 讨论

3.1 本法快速、简便、重现性好,且样品不易流失,为蜘蛛香质量控制和评价提供了可靠的依据。

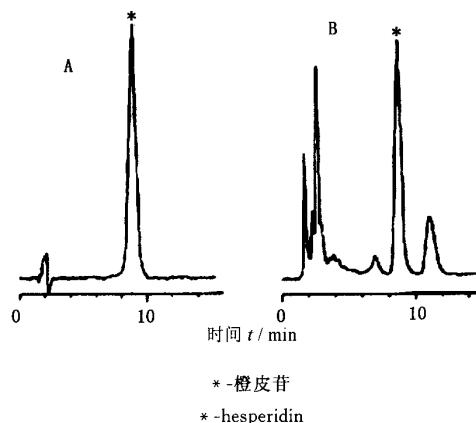


图 1 橙皮苷对照品 (A) 和蜘蛛香样品 (B) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of hesperidin reference substance (A)
and *V. jatamansi* (B)

3.2 蜘蛛香购于贵州贵阳、河北安国、四川成都的样品中橙皮苷的含量较高;购于四川雅安、陕西咸阳、云南昆明的蜘蛛香样品中橙皮苷的含量较低;采于四川峨眉山的蜘蛛香样品中橙皮苷的含量最低,可能与所采集样品为一年生蜘蛛香、根茎较细有关,这也说明橙皮苷的积累与生长年限、根茎粗细有关。

References:

[1] Marder M, Viola H, Wasowski C, et al. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS [J]. *Pharm Bio Behav*, 2003, 75(3): 537-545.

(上接第 418 页)

可见,八味锡类散灌肠给药可以提高外周血 CD8 淋巴细胞水平、降低 CD4/CD8 比值;在结肠黏膜局部提高 CD4 淋巴细胞水平、降低 CD8 淋巴细胞及 TNF- α 的表达,以及结肠损伤评分方面均优于灌胃给药,说明八味锡类散结肠局部给药治疗 UC 疗效优于灌胃给药,结肠局部给药可促进有效作用成分迅速地释出,起到抗炎作用,部分药物还能迅速黏附于溃疡表面起到对局部黏膜的保护作用;另一方面通过肠道对药物有效成分的吸收,可调整体内及局部免疫平衡,从而起到全面整体的预防治疗作用。

References:

[1] Zheng H B, Hu H Y, Lu X, et al. The experimental study on the therapeutic effects of Qing Chang Enema on ulcerative colitis [J]. *Acta Univ Tradit Chin Med Shanghai* (上海中医药大学学报), 2000, 14(4): 54-56.

[2] Zhu F, Qian J M, Pan G S. The establishment of enteric inflammatory reaction animal model by cellular immune

reaction [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 1998, 20(4): 271-277.

[3] Bhan A K, Mizoguchi E, Smith R N, et al. Colitis in transgenic and knockout animal as model of human inflammatory bowel disease [J]. *Immunol Rev*, 1999, 169: 195-207.

[4] Mosmann T R, Sad S. The expanding universe of T cell subsets; Th1, Th2, and more [J]. *Immunol Today*, 1996, 17 (3): 138.

[5] Neurath M F. Immunotherapy of inflammatory bowel disease: current concepts and future perspectives [J]. *Arch Immunol Ther Exp* (Warsaw), 2000, 48: 81-84.

[6] Ding W Q, Lin Y J, Xu S R, et al. Tumor necrosis factor and ulcerative colitis [J]. *Chin J Dig* (中华消化杂志), 2001, 21(8): 499-500.

[7] Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis [J]. *J Gastroenterol*, 1999, 34: 66.

[8] Po X. The effects of some herbal extracts on lymphocyte proliferation [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2003, 10(6): 351-352.