

复方肠泰对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎治疗作用的研究

刘茉莉¹, 陈刚¹, 林琳², 王建华², 杨洋², 王小宁², 庞中化², 王旻^{1*}, 曹鹏^{2*}

1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009

2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

摘要:目的 探讨复方肠泰对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠慢性溃疡性结肠炎(UC)的治疗作用。方法 随机将 C57BL/6 小鼠分为正常对照组、DSS 模型组、复方肠泰给药组。采用 2% DSS 溶液对小鼠进行造模, 小鼠连续 5 d 自由饮用 DSS 水, 接着连续 5 d 自由饮水, 重复 3 个循环。复方肠泰组每天按照 18 g/kg ig 给药, 其他组 ig 给予相同体积的蒸馏水。每天记录小鼠体质量、疾病活动指数(DAI)评分结果, 采用 HE 染色观察结肠组织病理学变化, 给予组织病理学评分; ELISA 检测 TNF- α 、IL-10 表达水平, 免疫组化检测 COX-2 蛋白表达情况。**结果** 与 DSS 模型组比较, 复方肠泰组小鼠疾病状态得到明显改善, DAI 和组织病理学评分显著降低, 炎症因子 IL-10 表达升高, TNF- α 、COX-2 蛋白的表达降低。**结论** 复方肠泰对小鼠慢性 UC 具有显著地治疗作用, 可能通过促进抗炎因子 IL-10 的表达, 同时抑制促炎症因子 TNF- α 、COX-2 蛋白的表达发挥作用。

关键词: 复方肠泰; 慢性溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)01-0052-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.008

Therapeutic effect of Fufang Changtai on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis

LIU Mo-li¹, CHEN Gang¹, LIN Lin², WANG Jian-hua², YANG Yang², WANG Xiao-ning², PANG Zhong-hua², WANG Min¹, CAO Peng²

1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Jiangsu Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of Fufang Changtai on dextran sulfate sodium (DSS)-induced chronic ulcerative colitis (UC) in mice. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: Vehicle group, DSS model group, and Fufang Changtai group. The model of colitis in mice was induced by drinking water containing 2% DSS for 5 d, followed by 5 d of normal water for 3 times. In Fufang Changtai group, the mice were ig given Fufang Changtai 18 g/kg per day during DSS treatment. Mice in Vehicle group and DSS model group were given the same volume of water, instead. Body weight and disease activity index (DAI) score were recorded every day. The colorectal mucosal histological changes were observed by HE staining. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) levels in colorectal tissue were determined by ELISA. The expression of COX-2 was determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the DSS groups, Fufang Changtai group could significantly improve the symptoms, reduce colonic DAI and histological scores. The levels of TNF- α and COX-2 were markedly decreased accompanying with IL-10 content increasing by the treatment of Fufang Changtai. **Conclusion** Fufang Changtai has the therapeutic effects on DSS-induced UC in mice, which is probably mediated by the enhancement of anti-inflammatory cytokines IL-10 and the inhibition of pro-inflammatory cytokines TNF- α and COX-2.

Key words: Fufang Changtai; chronic ulcerative colitis; dextran sulfate sodium

炎症性肠病(IBD)是一种慢性肠道炎症性疾病, 主要包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)^[1]。其中, UC 是一种原因不明的肠道非特异性炎症, 临床表现为急性疼痛、呕吐、体重减轻、腹泻、便

收稿日期: 2015-05-04

基金项目: 国家自然科学基金(81302968); 中国中医科学院自主选题课题(ZZ08080012)

作者简介: 刘茉莉, 硕士研究生, 研究方向为分子药理。Tel: 18252096380 E-mail: 401284672@qq.com

*通信作者 王旻, 教授, 博士生导师, 主要从事抗肿瘤药物的分子机制研究。Tel: (025)83271395 E-mail: minwang@cpu.edu.cn

曹鹏, 研究员, 研究生导师, 主要从事分子药理研究。Tel: (025)85608666 E-mail: cao_lab@126.com

血等症状^[2]。由于其具有病程长、难治愈,易反复发作的特点,已被 WHO 列入世界难治疾病的行列。近年来,UC 在我国的发病率有持续上升趋势,有研究表明 UC 病程越长,UC 相关性结肠癌的发生率就越高。目前,治疗 UC 的常用药物包括氨基水杨酸、类固醇类激素、免疫抑制剂等药物。但这些药物治疗成本高、副作用大,因此找到有效的、成本相对较低的药物成为研究的重点^[3]。中草药在治疗 UC 方面表现了一定的治疗优势,其副作用小,而且成本低,被越来越多的应用于临床。复方肠泰是江苏省中医药研究院近年来参考现代研究筛选出的对大肠癌细胞敏感的中药复方,对于治疗结肠癌具有一定的治疗效果^[4],基于 UC 与结肠癌的密切相关性,本研究主要探讨复方肠泰对于慢性 UC 的治疗作用。

1 材料

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠,8 周龄,体质量 18~22 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号 SCXK(苏)2011-0003,饲养条件为 SPF 级,室温为 22~25 °C,湿度为 40%~70%,自由饮食和饮水,12 h 黑夜,12 h 白天。

1.2 试剂

葡聚糖硫酸钠(DSS,相对分子质量 36 000~50 000),购自美国 Sigma-Aldrich;COX-2 抗体购自美国 Santa Cruz 生物科技公司;羊抗兔抗体 IgG 和羊抗鼠抗体 IgG 购自美国 Lincoln 公司;GAPDH 单克隆鼠抗购自康辰公司;COX-2 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;ELISA 试剂盒(TNF- α 、IL-10)购自上海联硕生物科技有限公司。

1.3 复方肠泰的制备

复方肠泰由人参 10 g、薏苡仁 20 g、白花蛇舌草 15 g、莪术 10 g、独角蜈蚣 3 g、八月扎 10 g、藤梨根 30 g 组成,由江苏省中医药研究院提供,由江苏省中医药研究院王大为博士鉴定。将药材置于 10 倍体积的蒸馏水中浸泡 30 min,加热到 100 °C,加热 1 h 后除去药渣,获得滤液。再补充 8 倍体积的蒸馏水同样的条件第二次加热。将两次获得的滤液混合(HPLC 法测定人参皂苷 Rb₁ 为 5.02 mg/g),并分装保存于-80 °C 冰箱。

2 方法

2.1 动物分组

随机将小鼠分为 3 组,每组 7 只。对照组,自

由饮水进食。DSS 模型组,连续 5 d 自由饮用 2% DSS 溶液,接着连续 5 d 自由饮水,重复 3 个循环^[5]。复方肠泰组,小鼠造模同时,每天给每只小鼠 ig 复方肠泰 18 g/kg,对照组和 DSS 模型组 ig 给予同样体积的蒸馏水。

2.2 结肠炎评分指标

每天记录小鼠体质量、大便性状、大便隐性或显性出血情况。按照 Murano^[6]提供的疾病活动指数[DAI=(体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3]进行评分,具体评分细则见表 1;在麻醉条件下,处死小鼠,取结直肠,测量其长度。将末端结直肠固定在 4%的多聚甲醛中,用石蜡包埋,进行 HE 染色。组织病理学评分按照 Dou^[7]提供的方法。

表 1 疾病活动指数

Table 1 Disease activity indexes

得分	体质量下降/%	大便性状	隐血/血便
0	0	正常	隐血阴性
1	1~5	松散	隐血阳性
2	5~10	松散	隐血阳性
3	11~15	松散	隐血阳性
4	>15	腹泻	肉眼血便

2.3 ELISA 检测

取结直肠组织加入裂解缓冲液制备组织匀浆,提取总蛋白,4 °C、12 000×g 离心 15 min。总蛋白量用 BCA 蛋白定量试剂盒检测^[8]。ELISA 试剂盒检测小鼠结直肠组织中 TNF- α 、IL-10 浓度变化^[9-10]。

2.4 免疫组化分析

取石蜡包埋的 5 μ m 的结直肠切片,分析 COX-2 蛋白表达情况^[11]。免疫组化实验操作过程主要包括脱蜡、水化,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,以及高温加热修复抗原。10%山羊血清孵育 10 min 之后,标本在 4 °C 下与一抗孵育,过夜,之后标本在 37 °C 下与二抗以及生物素-HRP 孵育 30 min。苏木精复染后,DAB 检测免疫反应。COX-2 定量计算方法:400 倍光镜下随机选取 10 个视野,COX-2 蛋白阳性染色位于细胞质内,出现淡黄色至棕褐色颗粒,以定位明确、染色明显、无明显背景着色、平均 20%以上细胞染色的组织切片视为阳性,而染色弱或不染色者为阴性。

2.5 数据分析

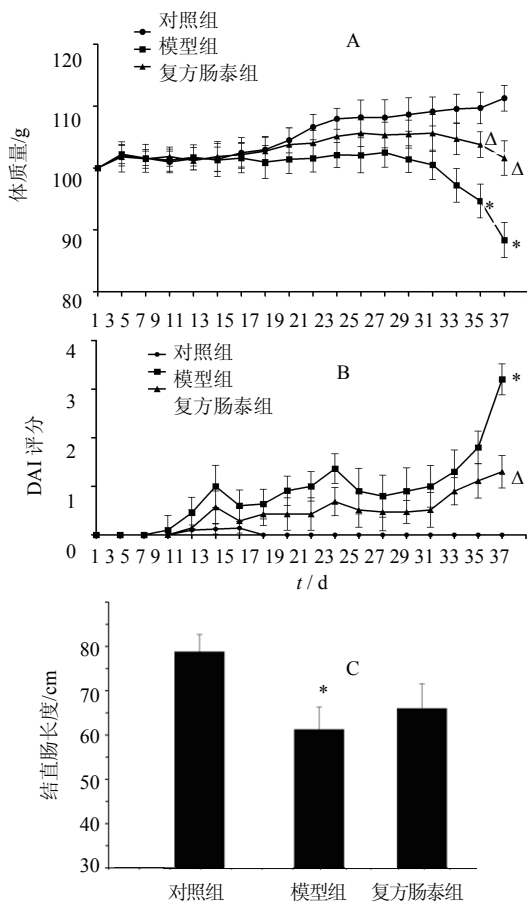
使用 SPSS 15.0 对数据进行分析处理,计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠体质量和 DAI 比较

2% DSS 成功诱导小鼠产生了慢性 UC。如图 1, DSS 模型组小鼠在造模第二个循环期间, 出现体质量下降, 第三个循环之后体质量明显下降。复方肠泰显著改善了小鼠体质量下降程度。造模 7 d 后, DSS 模型组小鼠有稀便, 甚至出现便血, DAI 评分结果急剧上升。复方肠泰组小鼠也有稀便、便血出现, 但 DAI 评分明显低于 DSS 模型组。结直肠长度变短是结直肠出现炎症的一个重要指标。而 DSS 模型组小鼠解剖后得到的结直肠长度明显变短。复方肠泰组结直肠长度明显长于 DSS 模型组。



与对照组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$; 下同
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group same as below

图 1 各组小鼠体质量变化 (A)、DAI 评分 (B)、结直肠长度 (C) 结果

Fig. 1 Body weight changes (A), DAI scores (B), and colorectal length (C) of mice in each group

3.2 各组小鼠结直肠组织病理学比较

将小鼠结直肠组织进行 HE 染色, 结果见图 2, 与对照组相比, DSS 模型组小鼠结直肠黏膜上皮细胞损坏, 腺窝结构破坏, 可见密集的炎症细胞浸润。复方肠泰组小鼠结直肠结构基本恢复正常, 黏膜较为完整, 出现的炎症细胞较少。如图 2D 组织病理学评分, 复方肠泰组明显低于 DSS 模型组 ($P < 0.05$)。

3.3 炎症因子 TNF- α 、IL-10、COX-2 表达情况

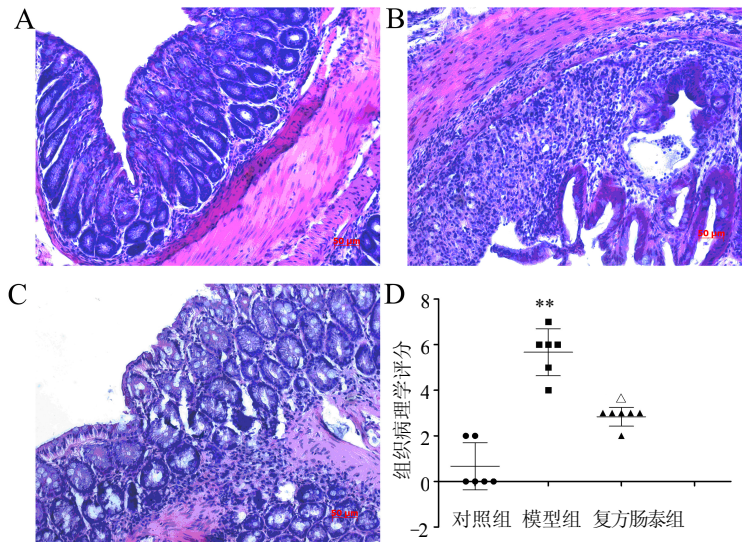
为了进一步确定小鼠结直肠组织炎症状况, 主要检测了炎症因子 TNF- α 、IL-10、COX-2 的表达情况。结果见图 3, 与对照组相比, DSS 模型组 TNF- α 和 COX-2 水平显著升高。复方肠泰组的 TNF- α 和 COX-2 水平与 DSS 模型组相比显著降低 ($P < 0.05$)。与对照组相比, DSS 模型组 IL-10 水平降低, 复方肠泰组则显著升高 ($P < 0.05$)。上述结果表明, 复方肠泰能有效地抑制促炎症因子 TNF- α 、COX-2 蛋白的表达, 同时有效地促进抗炎因子 IL-10 的表达, 说明复方肠泰对慢性 UC 有很好的逆转作用。

4 结论

尽管近几年关于 UC 发病机制的研究已取得不错的进展, 但仍有很多问题尚待进一步研究。最新的理论指出, UC 发病主要与肠道的免疫功能紊乱、肠道菌群和屏障功能的改变、肠道感染、饮食、遗传易感、精神因素等密切相关。另外, 这些因素可能相互交叉调节^[12]。

遗传和环境被认为是肠道屏障受损的首要因素。二者的结合将导致肠道共生微生物以及它们的代谢产物转移到肠壁。这些具有侵害性的抗原将激活免疫细胞产生细胞因子, 引起急性炎症反应。机体无法通过抗炎机制或抑制促炎症反应来解决急性黏膜炎症, 进而发展成了慢性炎症。更严重的是, 肠道黏膜细胞因子渗透可能引起组织损害如纤维化、脓肿、溃烂、甚至肿瘤^[13]。UC 作为炎症性肠病的一种典型, 首先发病于直肠, 并继续延伸到整个结直肠, 同时伴有腹泻、腹痛、便血、发烧、体质量减轻等症状^[14]。

中医认为 UC 主要发病机制为湿热蕴肠, 气血不调, 使肠道传导失司, 脂络受伤, 气滞血凝, 腐败成疡, 化为脓血。目前有很多经典的传统中药复方用于治疗 UC, 包括黄芩汤、白头翁汤、四君子汤、理中汤、葛根芩连汤等^[15-16]。复方肠泰由人参、薏苡仁、白花蛇舌草、莪术、独角蜚螂、八月扎、藤梨根组成, 具有健脾益气、清热解毒、活血化瘀、



A-对照组; B- DSS 模型组; C-复方肠泰组; D-组织病理学评分

图2 各组小鼠结直肠组织 HE 染色图及组织病理学评分

Fig. 2 HE Staining results and histology scores in colorectal tissue of mice in each group

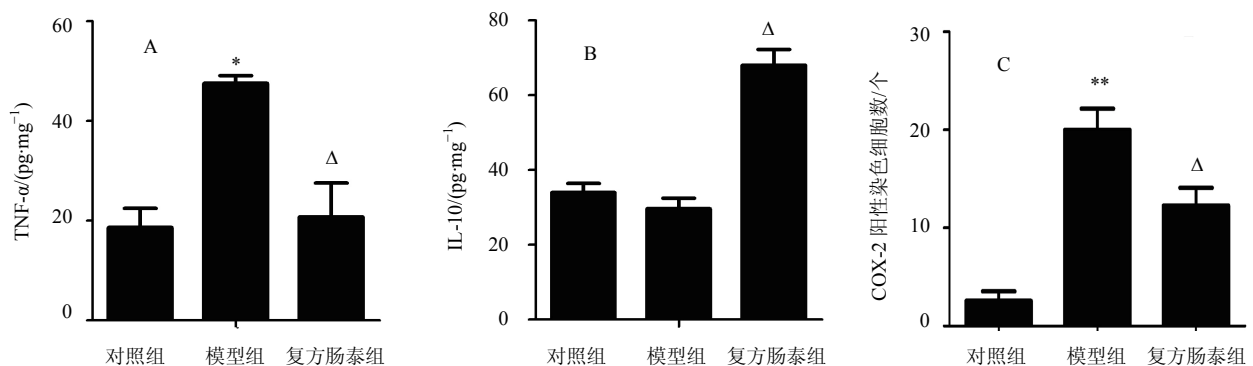


图3 小鼠结直肠组织炎症因子 TNF-α (A)、IL-10 (B)、COX-2 (C) 表达情况

Fig. 3 Expression of TNF-α (A), IL-10 (B), and COX-2 (C) in colorectal tissue of mice

消肿散结等作用。临床研究显示其与 FOLFOX 4 化疗方案联用能显著改善结肠癌患者生活质量, 提高其体力状况^[17]。体外研究表明, 复方肠泰能诱导结肠癌细胞 SW480 凋亡。本实验旨在探究其对 UC 小鼠的治疗效果。

本实验使用 DSS 成功诱导了小鼠结肠炎模型, DSS 诱导的 UC 动物模型的病理改变与人类 UC 临床症状相似, 比如典型的腹泻、便血、体质量减轻, 组织病理学变化如结肠黏膜充血水肿, 结构破坏, 大量炎细胞浸润等。以上实验结果表明, 复方肠泰对于 UC 小鼠模型具有显著的治疗效果。复方肠泰组小鼠体质量减轻程度、DAI 评分相对于 DSS 模型组小鼠得到显著改善。小鼠结直肠组织 HE 染色结

果表明, 小鼠服用复方肠泰后, 被破坏的结直肠结构明显得到恢复。而且, 复方肠泰通过上调抗炎因子 IL-10 的同时抑制 TNF-α、COX-2 蛋白的表达明显改善了小鼠结直肠组织炎症状况。

由于结肠炎发病原因复杂, 且炎症出现反复^[18], 经久不愈, 病史越长引发结肠炎相关性结直肠癌的可能越高, 25 年病史以上的患者有 40% 癌变。结肠炎相关性结肠癌成为结肠炎患者的重要死亡原因^[19-20]。目前, 癌症的化学预防已经成为新的研究热点。因此复方肠泰治疗 UC 的显著效果对于预防结肠炎相关性结直肠癌具有一定的指导意义。

参考文献

[1] Tanaka T. Development of an inflammation-associated

- colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention [J]. *Int J Inflamm*, 2012, 2012: 658786.
- [2] Lombardi V R, Etcheverria I, Carrera I, *et al.* Prevention of chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) in mice treated with FR91 [J]. *J Biomed Biotech*, 2012, 2012: 826178.
- [3] Fang J, Seki T, Tsukamoto T, *et al.* Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (canolol) involves suppression of oxidative stress and inflammatory cytokines [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(12): 2833-2841.
- [4] 李灵常, 方明治, 王小宁, 等. 复方肠泰联合 FOLFOX4 方案治疗大肠癌的临床观察 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 10(15): 919-921.
- [5] Valdez-Morales E, Guerrero-Alba R, Ochoa-Cortes F, *et al.* Release of endogenous opioids during a chronic IBD model suppresses the excitability of colonic DRG neurons [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25(1): 39-46.
- [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] Dou W, Zhang J, Zhang E, *et al.* Chrysin ameliorates chemically induced colitis in the mouse through modulation of a PXR/NF-kappa B signaling pathway [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2013, 345(3): 473-482.
- [8] Liu W, Guo W, Wu J, *et al.* A novel benzo [d] imidazole derivate prevents the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. *Biochem Pharm*, 2013, 85(10): 1504-1512.
- [9] Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho J K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastr*, 2008, 14(27): 4280-4288.
- [10] Louis E, Libioulle C, Reenaers C, *et al.* Genetics of ulcerative colitis: the come-back of interleukin 10 [J]. *Gut*, 2009, 58(9): 1173-1176.
- [11] Paiotti A P, Artigiani Neto R, Forones N M, *et al.* Immunoexpression of cyclooxygenase-1 and-2 in ulcerative colitis [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2007, 40(7): 911-918.
- [12] Seril D N, Liao J, Yang G Y, *et al.* Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(3): 353-362.
- [13] Neurath M F. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Imm*, 2014, 14(5): 329-342.
- [14] Jin J. JAMA patient page. Inflammatory bowel disease [J]. *JAMA*, 2014, 311(19): 2034.
- [15] Zhang C, Jiang M, Lu A. Considerations of traditional Chinese medicine as adjunct therapy in the management of ulcerative colitis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44(3): 274-283.
- [16] Salaga M, Zatorski H, Sobczak M, *et al.* Chinese herbal medicines in the treatment of IBD and colorectal cancer: a review [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2014, 15(3): 405-420.
- [17] 陈永乐, 姚 远. 复方肠泰联合 FOLFIRI 方案化疗治疗晚期结直肠癌临床疗效观察 [J]. *当代医学*, 2012, 18(15): 36-38.
- [18] Aust D E, Terdiman J P, Willenbacher R F, *et al.* The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis [J]. *Cancer*, 2002, 94(5): 1421-1427.
- [19] Carrier J, Medline A, Sohn K J, *et al.* Effects of dietary folate on ulcerative colitis-associated colorectal carcinogenesis in the interleukin 2-and beta (2)-microglobulin-deficient mice [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12(11 Pt 1): 1262-1267.
- [20] Eaden J A, Abrams K R, Mayberry J F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis [J]. *Gut*, 2001, 48(4): 526-535.