

溃结康对三硝基苯磺酸诱导大鼠炎症性肠病的作用研究

聂朝宏¹, 温克², 赵敏³, 焦建杰², 娄建石²

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津医科大学, 天津 300070

3. 天士力制药集团股份有限公司研究院, 天津 300410

摘要: **目的** 观察溃结康经灌肠给药对三硝基苯磺酸 (trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 诱导的炎症性肠病动物模型的作用, 以明确溃结康对炎症性肠病的治疗作用, 为探索药物应用于克罗恩病治疗的可行性。**方法** 采用 TNBS 灌肠的方法诱导大鼠溃疡性结肠炎模型, 观察溃结康灌肠给药对大鼠疾病活动指数 (DAI) 评分、血清干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-1 (IL-1)、白介素-4 (IL-4)、白介素-10 (IL-10) 和肠黏膜中谷氨酰胺 (Glutamine, Gln) 的含量的影响, 并观察药物对大鼠结肠组织损伤评分以及病理学的影响。**结果** TNBS 诱导的结肠炎模型可引起动物体质量下降, 肉眼血便或便潜血阳性, DAI 评分增高, 血清 IFN- γ 、IL-1 升高, 肠黏膜 Gln 降低, 溃结康不同剂量组灌肠给药可改善 TNBS 引起的 DAI 评分增高以及降低血清 IFN- γ 、IL-1 水平, 升高肠黏膜 Gln, 缓解结肠炎组织学变化, 其中尤以溃结康高剂量组作用更为明显。**结论** 溃结康灌肠给药对缓解 TNBS 诱导结肠炎模型有一定治疗作用。

关键词: 溃结康; 炎症性肠病; 疗效

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)01-0057-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.009

Effect of Kuijie Kang on rats with inflammatory bowel disease induced by TNBS

NIE Chao-hong¹, WEN Ke², JIAN Jian-jie², ZHAO Min³, LOU Jian-shi²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Tasly Pharm., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To observe the effect of Kuijie Kang on model induced by trinitrobenzene sulfonic acid, to examine its efficacy for inflammatory bowel disease, and to explore the feasibility of this medicine used for treatment of Cronh's disease. **Methods** Rat model of inflammatory bowel disease was set up by rectally administration of TNBS, and the effects of Kuijiekang on indexes of DAI, IFN- γ , IL-1, and IL-4, as well as and the content of glutamine (Gln) in rats were determined. **Results** The rats with inflammatory bowel disease induced by TNBS have decreased body weight, macroscopical or microscopical hematochezia, increased DAI score, increased levels of IFN- γ and IL-1, and decreased Gln. Different doses of Kuijiekang could significantly improve the change of DAI score, lower the levels of IFN- γ and IL-1, raise the Gln in intestinal mucosa caused by TNBS, and relieve the histology change of colon inflammation, the highest dose with the most significant effect. **Conclusion** Kuijiekang rectly administered is effective for the colitis model induced by TNBS.

Key words: Kuijiekang; inflammatory bowel disease; efficacy

克罗恩病为消化系统常见病、难治病。发病原因尚不清楚, 目前主要认为该病与 Th1 细胞和 Th2 细胞的平衡失调而导致的自发免疫反应有关^[1-2]。临床治疗药物主要包括水杨酸、糖皮质激素和免疫抑制剂等, 虽有一定疗效, 但长期应用有较多副作用。溃结康是天士力控股集团有限公司开发的中药六类

新药, 由血竭、赤芍、青黛、赤石脂等 8 味中药配制而成, 临床具有清热除湿、活血化瘀之功效, 主要用于溃疡性结肠炎证见湿热血瘀, 泄泻, 腹痛, 里急后重, 下利赤白脓血者。早期斑马鱼实验模型提示溃结康有可能通过缓解炎症, 发挥治疗克罗恩病的作用。为进一步验证溃结康的治疗克罗恩病作

收稿日期: 2015-06-16

作者简介: 聂朝宏, 男, 天津人, 天津市“131”创新型人才培养工程第二层次人选, 长期从事新药研发。E-mail: pharmdoc@126.com

用, 本研究观察溃结康灌肠给药对三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导的疾病模型的治疗作用, 以明确溃结康对克罗恩病的疗效, 探索该药物应用于克罗恩病治疗的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 180~220 g, 动物合格证号: SCXK-(军)2009-003, 由军事医学科学院卫生学环境医学研究所动物实验中心提供。

1.1.2 药品及试剂 溃结康 (批号 20121102), 由天士力制药集团股份有限公司提供; 美沙拉嗪肠溶片 (批号 130110), 由黑龙江葵花药业有限公司生产; 5% TNBS 购自 sigma 公司。干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-1 (IL-1)、白介素-4 (IL-4)、白介素-10 (IL-10)、谷氨酰胺 (Gln) Elisa 测试盒购自 bioswamp 公司。便潜血试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.1.3 仪器 AB135-S 电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 SD 大鼠依据随机数字表随机分为正常组、模型组、阳性对照药物 (美沙拉嗪) 组、以及溃结康高、中、低剂量共 6 个组, 每组 10 只。

1.2.2 模型建立 参考 Morris 方法^[3], 应用 TNBS 制备大鼠克罗恩病模型。大鼠造模前 24 h 禁食、不禁水。大鼠称重后, ip 戊巴比妥钠麻醉。(1) 制备 TNBS 灌肠液: 将 5% TNBS 与无水乙醇以 2:1 (体积比) 混合均匀, 装瓶 4 °C 保存。(2) 灌肠: 造模大鼠以 TNBS 溶液 150 mg/kg (4.5 mL/kg) 灌肠; 正常组大鼠用相同体积的 0.9%氯化钠注射液灌肠。灌肠器 (外径 2 mm 乳胶管) 插入肛门 6~8 cm, 注入灌肠液。然后提起大鼠尾部, 倒置 1 min, 使 TNBS 充分作用于肠腔, 防止液体溢出。

1.2.3 给药方法^[4] 各治疗组给药体积均为 7 mL/kg, 正常组和模型组均给予同体积溶剂。各受试药物组按由高到低不同浓度 (分别相当于 2.023、1.012、0.506 g 生药/kg) 给予实验药物。阳性对照药给药剂量为 100 mg/kg。每日 1 次灌肠给药, 连续 21 d。末次给药后继续观察 24 h。

1.2.4 检测指标

(1) 一般情况: 每天观察体质量变化、粪便情况 (便潜血、血便、腹泻)。进行疾病活动指数 (DAI) 评分。

DAI = (体质量下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数) / 3

(2) 血清学检查: 末次给药后 (第 21 天) 禁食不禁水, 24 h 后腹主动脉取血, 酶联免疫吸附法测定鼠血清中 IFN- γ 、IL-1、IL-4 和肠黏膜中 Gln 的量。

(3) 病理学检查: 取大鼠结肠, 进行结肠组织损伤评分, 常规 HE 染色, 进行病理组织学检查 (0=无损伤, 1=充血水肿, 但无溃疡; 2=有溃疡, 但无明显的炎症; 3=有溃疡, 仅有一处出现炎症; 4=有两处或以上溃疡和炎症, 溃疡大小 < 1 cm; 5=有两处或以上溃疡或炎症, 至少一处溃疡或炎症部位 > 1 cm)。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差分析和 student *t* 检验。

2 结果

2.1 模型评价及治疗干预

正常组大鼠体质量未见明显下降, 无腹泻、血便及便潜血阳性的粪便性状异常改变。模型组动物经 TNBS 灌肠后 1 d 粪便即表现为肉眼血便, 并伴有体质量下降, 此症状持续 6~8 d。第 9 天后大便陆续表现为便潜血强阳性, 稀便, 动物体质量逐渐增加。经造模后的模型组 DAI 评分明显高于正常组 ($P < 0.01$)。

溃结康低、中、高剂量组及阳性对照组经 TNBS 灌肠后 6~8 d 内也出现体质量下降, 但与模型组比较, 下降程度较轻。动物粪便性状最初以便潜血阳性为主, 未见明显肉眼血便。至实验第 22 天除少数动物粪便潜血弱阳性外, 多数动物粪便性状恢复正常, 其中尤以溃结康高剂量组作用最为明显。各治疗组 DAI 评分明显低于模型组, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 免疫指标

与正常组比较, TNBS 模型组血清 IFN- γ , IL-1, IL-4 水平, 以及肠黏膜 Gln 均具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 阳性对照组能够降低血清 IFN- γ 和 IL-1 水平 ($P < 0.05$), 提高血清 IL-4 ($P < 0.01$) 和肠黏膜 Gln 水平 ($P < 0.05$), 溃结康高剂量组能够降低血清 IFN- γ 和 IL-1 水平 ($P < 0.01$), 中低剂量组作用不明显。溃结康高中低剂量组均能升高肠黏膜 Gln 水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 高低剂量组还能升高 IL-10 水平 ($P < 0.05$)。见图 2。

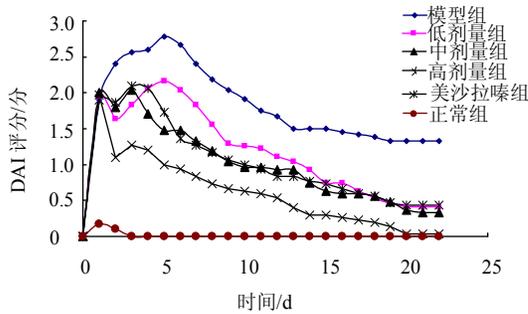
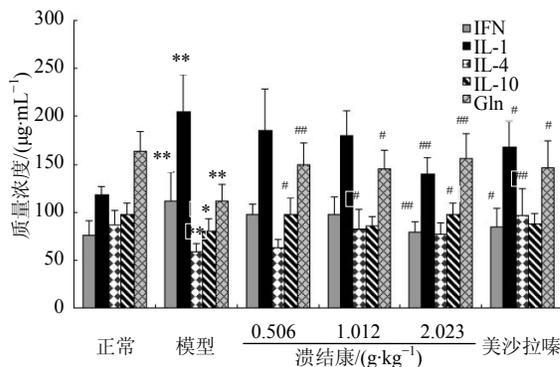


图1 溃结康灌肠给药对 TNBS 模型大鼠 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of Kuijie Kang on DAI score in TNBS induced model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs model group

图2 溃结康对 TNBS 模型大鼠血清中 IFN- γ 、IL-1、IL-4 和肠黏膜中 Gln 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of Kuijie Kang on levels of serum IFN- γ , IL-1, and IL-4 and colonic Gln in TNBS induced model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.3 病理检测

正常组大鼠肠黏膜表面光滑, 未见明显损伤, 镜下观察黏膜组织完整, 无充血水肿, 无炎细胞浸润及溃疡形成。模型组动物肠黏膜明显充血水肿、肠壁增厚严重, 多见肠管与周围组织粘连, 部分动物见肠管扩张、积气, 可见多处溃疡形成, 部分形成深大溃疡。显微镜观察均见炎症或溃疡, 其中部分呈透壁性炎症且溃疡深入浆膜层并穿孔。阳性对照组除少数动物结肠组织有轻度充血水肿外, 多未见显著病变, 显微镜观察发现 1 例结肠组织见溃疡病变, 多未见异常。溃结康低、中、高剂量组仅少数动物见肠壁轻度充血水肿, 与模型组比较结肠组织病变均有减轻, 尤以高、中剂量组明显。模型组

肠黏膜大体评分及组织评分明显高于正常组, 与正常组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$), 溃结康低中高剂量组可明显降低 TNBS 模型大鼠肠黏膜大体评分及组织评分, 其中尤以高剂量组最为明显 ($P < 0.05, 0.01$)。见表 1。

表1 溃结康灌肠对 TNBS 模型大鼠肠黏膜病理形态学影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Kuijie Kang on histological change of colon in TNBS induced model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	大体评分/分	组织评分/分
正常	—	0.000±0.000	0.17±0.41
模型	—	2.714±2.289**	2.83±2.14*
美沙拉嗪	0.1	0.500±0.707###	1.00±1.10
溃结康	2.023	0.200±0.422###	0.67±1.03#
	1.012	0.333±0.500###	0.50±0.55#
	0.506	0.875±1.356###	1.00±1.55

与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

炎症性肠病动物模型的建立方法有很多种, 如化学物诱导法(乙酸法、葡聚糖硫酸钠法、恶唑酮法)、免疫法(TNBS法)等^[5]。与众多模型比较, TNBS诱导炎症性肠病模型造模时间短, 炎症持续时间长, 重现性好, 操作简便, 目前广泛用于该类药物的疗效筛选研究。TNBS是一种半抗原物质, 灌肠后乙醇破坏肠黏膜屏障, TNBS可与组织蛋白结合形成抗原, 引起机体免疫反应, 导致肠黏膜的损伤^[6]。本研究发现, TNBS灌肠后, 与正常组比较, 模型组动物出现血便及体质量的下降, DAI评分增加。病理学检查显示, 模型组肠黏膜组织充血水肿明显、肠壁增厚严重, 粘连多见, 多处溃疡形成。溃结康治疗组DAI评分明显低于模型组, 同时溃结康亦可明显降低大鼠肠黏膜大体评分及组织评分, 改善受炎症侵袭肠道黏膜的受损程度, 降低动物肠黏膜充血水肿、肠壁增厚以及溃疡病变损害, 提示溃结康可缓解TNBS诱导的结肠炎。

TNBS 主要通过 Th1 细胞介导的慢性炎症反应, 其介导的肠道炎症过程中, 伴随了炎性介质的明显变化, 主要表现为促炎因子 IFN- γ 、IL-1 升高, 抗炎因子 IL-4、IL-10 低表达或正常水平^[7, 8]。溃结康不同剂量可降低 IFN- γ 、IL-1 水平, 提示其可能通过免疫调节机制对 TNBS 诱导的结肠炎发挥治疗作用。

Gln 是体内含量最丰富的氨基酸,是肠黏膜等多种组织细胞主要能源物质,是肠黏膜细胞代谢所必需底物。Gln 缺乏可引起肠黏膜细胞凋亡增加及增殖减少、肠道屏障功能受损^[8]。研究显示,模型组肠黏膜 Gln 明显低于正常组,而溃结康可提高肠黏膜 Gln 水平,提示溃结康具有一定的肠黏膜保护作用。

综上所述,溃结康可能通过免疫调节作用和肠黏膜保护作用等多重机制发挥对炎性肠病的治疗作用,这一机制有别于目前临床常见的水杨酸类药物,为现有治疗耐药/不耐受提供了更多的治疗选择。

参考文献

- [1] Neurath M F, Finotto S, Glimcher L H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity [J]. *Nat Med*, 2002, 8: 567-573.
- [2] Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease [J]. *Gut*, 2009, 58(8): 1152-1167.
- [3] Morris J P, Beck P L, Herridge M S, *et al.* Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795-803.
- [4] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [5] 孙晓萍, 侯丽娟, 王晓红, 等. 大鼠慢性溃疡性结肠炎模型的建立及操作规范探讨 [J]. *天津中医药*, 2012, 29(3): 270-274.
- [6] Guan Q, Ma Y, Hillman C L, *et al.* Targeting IL-12/IL-23 by employing a p40 peptide-based vaccine ameliorates TNBS-induced acute and chronic murine colitis [J]. *Mol Med*, 2011, 17 (7-8): 646-656.
- [7] Fuss I J, Marth T, Neurath M F, *et al.* Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 1999, 117(5): 1078-1088.
- [8] 路晓红, 杨恩来, 赵霞, 等. 溃疡性结肠炎免疫机制的研究进展 [J]. *山西中医学院学报*, 2011, 12(1): 66-70.
- [9] 孙敬平, 马洪升. 谷氨酰胺对肠黏膜细胞凋亡影响的研究进展 [J]. *四川医学*, 2008, 29 (2): 242-244.