

鞣酸蛋白酵母散对幼年大鼠腹泻的治疗作用及其机制研究

陆 濛^{1,2}, 刘 月^{1,2}, 舒 丹^{1,2}, 朱 映^{1,2}, 马源源^{1,2}, 苗 烁^{1,2}, 杨如萍^{1,2}, 明章银^{1,2*}

1. 华中科技大学同济医学院 基础医学院药理学系, 湖北 武汉 430030

2. 华中科技大学同济医学院 药物靶点研究与药效学评价湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430030

摘 要: 目的 研究鞣酸蛋白酵母散的治疗作用及其与保护肠黏膜、促进其修复的关系。方法 将48只21 d SD大鼠随机分为6组: 对照组、模型组、蒙脱石散(阳性药, 0.8 g/kg)组和鞣酸蛋白酵母散低、中、高剂量(0.1、0.3、0.9 g/kg)组。除对照组外, 所有动物用4 g/kg番泻叶水煎剂连续ig 2周后, ig给药, 对照组和模型组给予等体积的蒸馏水, 每天2次, 给药5 d。记录各组大鼠稀便率和腹泻指数。经治疗后, 取各组大鼠空肠做苏木精-伊红染色和免疫组化, 分别观察肠黏膜组织结构的变化和肠黏膜增殖细胞核抗原(PCNA)表达的变化。同时, 刮取大鼠空肠黏膜分别测定DNA、总蛋白和IL-6的表达水平。结果 与模型组比较, 经高剂量的鞣酸蛋白酵母散治疗后, 大鼠稀便率和腹泻指数显著降低($P < 0.001$), 空肠绒毛结构基本恢复正常, 空肠黏膜DNA含量显著增加($P < 0.05$), PCNA表达显著增加($P < 0.001$), IL-6表达减少。中剂量的鞣酸蛋白酵母散可改善大鼠腹泻, 但对其他指标没有显著影响。而低剂量的鞣酸蛋白酵母散则无作用。结论 鞣酸蛋白酵母散对幼年大鼠腹泻有治疗作用, 并可促进肠黏膜修复。

关键词: 鞣酸蛋白酵母散; 幼年大鼠; 腹泻; 肠黏膜修复; 蒙脱石散

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)07-1245-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.07.007

Effects of albumin tannate and barm powder on diarrhea and its diarrhea treatment-related mechanism

LU Meng^{1,2}, LIU Yue^{1,2}, SHU Dan^{1,2}, ZHU Ying^{1,2}, MA Yuanyuan^{1,2}, MIAO Shuo^{1,2}, YANG Ruping^{1,2}, MING Zhangyin^{1,2}

1. Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. HuBei Key Laboratory of Drug Target Research and Pharmacodynamic Evaluation, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To explore the effects of Albumin Tannate and Barm Powder on diarrhea and repairing injury of intestinal mucosa. **Methods** Forty-eight 21-day-old rats were randomly divided into six groups: control group, diarrhea modeling group, montmorillonite powder (0.8g/kg) group, Albumin Tannate and Barm Powder low, middle, and high doses (0.1, 0.3, and 0.9 g/kg) group. Except for control group, all rats were given with Senna leaf water decoction (4 g/kg) for two weeks, which was followed by treatment with corresponding drug or distilled water for 5 days. After measuring the diarrhea index, we take the jejunum for H&E stain and immunohistochemistry to evaluate tissue structure or the expression of PCNA. Besides these, scrape the intestinal mucosa to measure the level of DNA, protein and interleukin 6. **Results** Compared with model group, after the treatment of high dose of Albumin Tannate and Barm Powder, the defecation rate and diarrhea index of rats were significantly reduced ($P < 0.001$), the structure of jejunum villi was basically restored to normal, the DNA content of jejunum mucosa was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of PCNA was significantly increased ($P < 0.001$), and the expression of IL-6 was decreased. However, Albumin Tannate and Barm Powder of middle doses could only relieve diarrhea symptom and Albumin Tannate and Barm Powder of low doses had no effect on diarrhea. **Conclusion** Albumin Tannate and Barm Powder has good effect on diarrhea and promote the repair of intestinal mucosa.

Key words: Albumin Tannate and Barm Powder; Juvenile rats; diarrhea; intestinal mucosa repair; montmorillonite powder

收稿日期: 2019-12-29

第一作者: 陆 濛, 研究方向为药理学。E-mail: 2942658429@qq.com

*通信作者: 明章银 E-mail: zyming@hust.edu.cn

腹泻是儿童时期发病率最高的疾病之一和全球性公共卫生问题,据统计,全球每年约有20亿腹泻患者,约有80万儿童死于腹泻^[1]。我国每年有近4万例5岁以下儿童死于腹泻,腹泻是导致5岁以下儿童死亡的第2大原因^[2],因此,小儿腹泻病的防治至关重要。已有研究表明,鞣酸蛋白酵母散对小儿腹泻有显著疗效^[3]。康芝药业股份有限公司生产的鞣酸蛋白酵母散于2010年批准上市,主要适用于儿童肠炎或消化不良引起的腹泻。临床研究表明鞣酸蛋白酵母散对婴幼儿腹泻有良好疗效,且疗程短^[4-5],但其对幼年动物腹泻时肠黏膜的保护和修复作用尚缺少实验室证据。因此,本实验主要研究鞣酸蛋白酵母散对幼年大鼠腹泻的治疗作用及其治疗作用与促进肠黏膜修复的关系。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,3周龄,雄性,购自武汉市疾病控制中心,实验动物生产许可证号SCXK(鄂)2015-0018。所有动物在相对湿度55%~65%,温度22~24℃,自然光照条件下饲养,适应性喂养1周后进行实验。

1.2 药物

番泻叶,购于武汉天一中医医院,经该医院鉴定为狭叶番泻叶 *Cassia angustifolia* Vahl 的小叶。番泻叶水煎剂制备方法:200 g 番泻叶浸入1 000 mL 100℃蒸馏水中,浸泡30 min后用双层纱布滤过备用^[6]。鞣酸蛋白酵母散,康芝药业股份有限公司,产品批号180303,规格:鞣酸蛋白0.1 g/袋;蒙脱石散,博福-益普生(天津)制药有限公司,产品批号M23941,规格3 g/袋;4%多聚甲醛固定液(武汉谷歌生物科技有限公司);白介素(IL)-6 Elisa试剂盒(Elabscience);proteinase K, RIPA裂解液(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

组织研磨仪(武汉赛维尔生物有限公司, KZ-II);超声破碎仪(Sonics, VCX 130PB);低温离心机(上海市离心机械研究所, TL-18M);恒温浴槽(成都仪器厂, HSS-1(B));核酸浓度测定仪、酶标仪(Tecan公司, Sunrise)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法

48只SD大鼠随机分为6组:对照组、模型组、蒙脱石散(0.8 g/kg)组和鞣酸蛋白酵母散低、中、高剂量(0.1、0.3、0.9 g/kg)组,每只大鼠单笼饲养。除对

照组外,其他各组大鼠均ig给予番泻叶水溶液4 g/kg^[6],ig后5 h内每隔1 h观察大鼠腹泻情况,连续ig 2周,超过25%的糊状、水样便,少于25%块状、质地坚硬的便视为造模成功。造模成功后,ig给药,对照组和模型组给予等体积的蒸馏水,每天2次,给药5 d。最后1次给药后观察大鼠腹泻情况,计算各组大鼠稀便率和腹泻指数。

2.2 检测指标

2.2.1 腹泻指标 ①稀便率:给药后5 h内,记录每只大鼠的稀便次数和排便总次数。稀便率=动物排稀便次数/动物排便总次数;②腹泻指数:稀便率×平均稀便级。稀便级表示每只动物稀便程度,以稀便在滤纸上的污迹直径定级,分为4级:<1 cm为1级,1~1.9 cm为2级,2~3 cm为3级,>3 cm为4级。平均稀便级=所有稀便级数/稀便次数^[7]。

2.2.2 组织病理学 最后1次给药后,颈椎脱臼处死动物,在十二指肠下方3 cm处取1.5 cm左右的空肠,等渗盐水冲洗干净肠道内容物,于10%中性福尔马林溶液中固定,脱水包埋,进行HE染色,光镜下观察并比较各组大鼠小肠黏膜结构的变化情况。

2.2.3 肠黏膜增殖细胞核抗原(PCNA)表达测定 按“2.2.2”项下方法取材,10%中性福尔马林溶液中固定,常规石蜡包埋、切片。用免疫组织化学法检测肠隐窝中PCNA表达,每张切片随机选取20个隐窝,光镜下计数每个隐窝内PCNA表达阳性的平均细胞数^[8]。

2.2.4 小肠黏膜中DNA含量测定 处死动物后,在屈氏韧带下5 cm处取10 cm左右空肠,用等渗盐水冲洗肠道内容物,刮取肠黏膜组织。称取相同质量的黏膜组织分别用裂解液裂解后提取组织中DNA,测定DNA含量^[9]。

2.2.5 小肠黏膜中蛋白含量测定 各组分别称取相同质量的肠黏膜组织,加入RIPA裂解液后研磨,超声破碎,13 000 r/min离心15 min,取上清,用BCA试剂盒检测蛋白浓度^[7]。

2.2.6 肠黏膜IL-6表达测定 按质量体积比1:9的比例将肠黏膜组织与预冷的PBS混合加入匀浆器中,在冰上充分研磨。为确保组织细胞充分裂解,对匀浆液进行超声破碎。最后将匀浆液13 000 r/min离心15 min,取上清用IL-6 Elisa kit检测。

2.3 统计学方法

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Graphpad Prism 5软件以one-way ANOVA的统计学方法进行分析。

3 结果

3.1 鞣酸蛋白酵母散对腹泻的治疗作用

除对照组外,ig 番泻叶的各组大鼠腹泻率均为100%,排出大量含水和黏液的糊状粪便,同时伴精神萎靡,皮毛色泽变暗,肛周污秽。治疗5 d后,虽然各组大鼠仍有不同程度的腹泻,但与模型组比较,蒙脱石散和中、高剂量的鞣酸蛋白酵母散均显著降低大鼠的稀便率和腹泻指数($P<0.001$),见图1,并且蒙脱石散和高剂量的鞣酸蛋白酵母散对腹泻的治疗作用无显著差别。

3.2 鞣酸蛋白酵母散对肠黏膜的修复作用

3.2.1 鞣酸蛋白酵母散促进肠绒毛形态恢复 HE

染色中模型组大鼠肠绒毛出现固有层分离,柱状上皮细胞形态和排列方式异常,说明番泻叶造模后引起大鼠空肠黏膜损伤。经治疗后,蒙脱石散组和鞣酸蛋白酵母散高剂量组肠绒毛形态均基本恢复正常,且两者的恢复程度无明显区别。中剂量的鞣酸蛋白酵母散可使大鼠肠黏膜结构有一定程度的恢复,而低量的鞣酸蛋白酵母散则无此作用,见图2。

3.2.2 鞣酸蛋白酵母散促进小肠黏膜组织DNA的表达

与对照组比较,模型组肠黏膜组织中DNA表达降低($P<0.01$),给予高剂量的鞣酸蛋白酵母散后肠黏膜组织中的DNA含量显著高于模型组($P<0.05$)。给予蒙脱石散和低、中剂量的鞣酸蛋白酵母

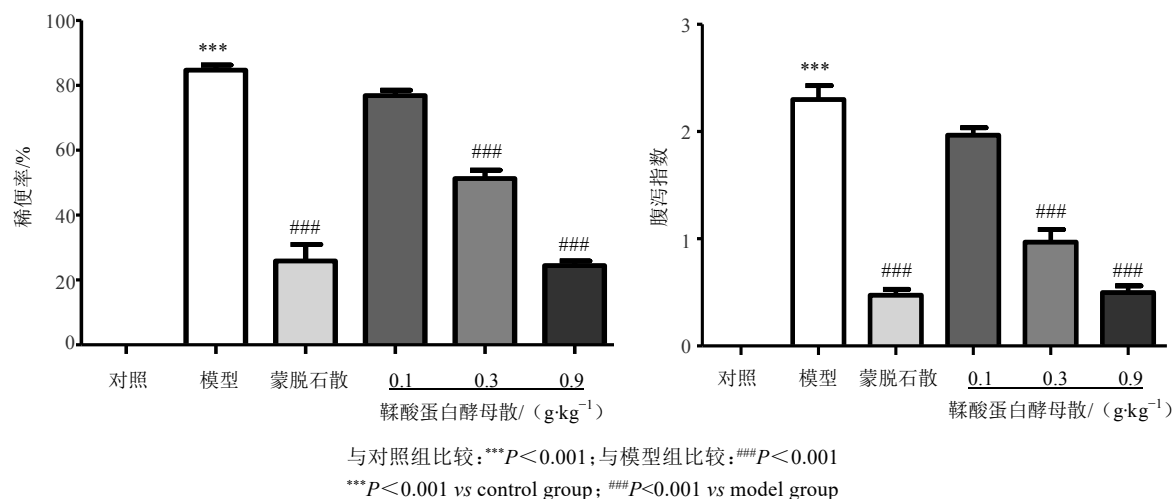


图1 6组大鼠的稀便率和腹泻指数($\bar{x} \pm s, n=8$)
 Fig. 1 Lose stools rate and diarrhea index of rats in defferent groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

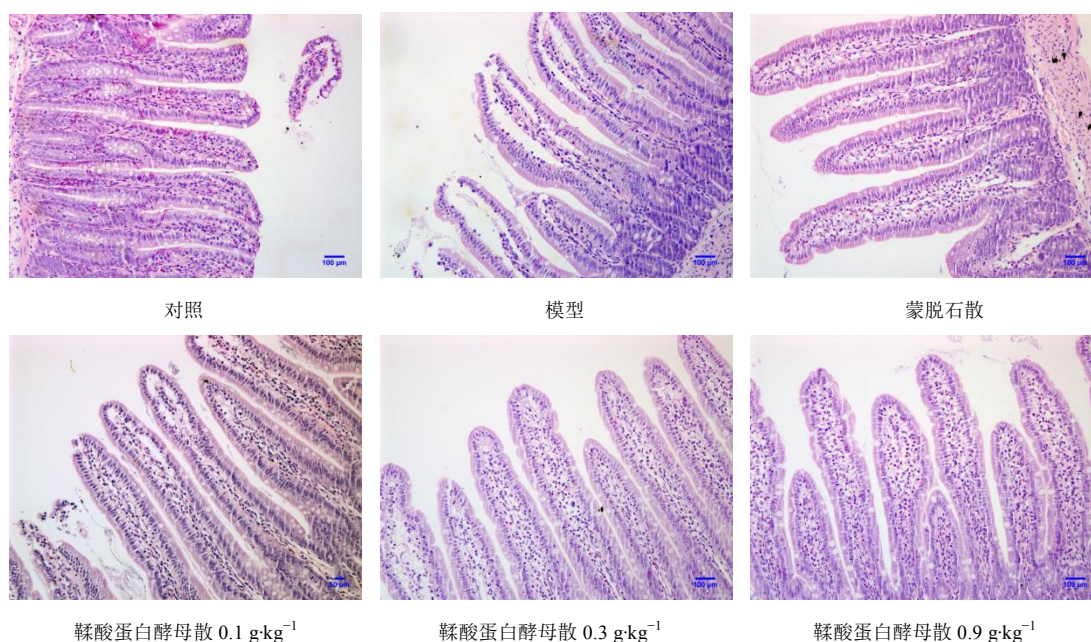


图2 6组大鼠空肠组织HE染色
 Fig. 2 HE staining of rat jejunal in different groups

散后这一变化无统计学差异。与DNA含量不同的是,各组动物肠黏膜的蛋白表达量无明显差异,见图3。

3.2.3 鞣酸蛋白酵母散促进肠隐窝PCNA的表达与对照组比较,番泻叶造模后大鼠肠黏膜PCNA表达降低($P < 0.001$),高剂量的鞣酸蛋白酵母散治疗后这一现象则被逆转,且高剂量的鞣酸蛋白酵母散的这一作用明显优于蒙脱石散($P < 0.001$),而蒙脱石散和低、中剂量的鞣酸蛋白酵母散则无此作用,见图4。结果表明,鞣酸蛋白酵母散能够促进大鼠肠黏膜增殖。

3.2.4 鞣酸蛋白酵母散降低肠黏膜组织IL-6水平与对照组比较,模型组在给予番泻叶两周后IL-6水平显著升高($P < 0.05$),在分别给予高剂量的鞣酸蛋白酵母散和蒙脱石散后,IL-6水平均有降低趋势但无统计学差异,低和中剂量的鞣酸蛋白酵母散治疗

后无此趋势(图5)。

4 讨论

腹泻作为儿童常见病,腹泻是导致5岁以下儿童死亡的第2大原因,因此儿童腹泻的防治至关重要。腹泻多表现为小肠黏膜损伤,水肿和结构破坏,而肠黏膜损伤可引起肠黏膜屏障功能受损,进一步导致细菌移位和促炎因子大量释放,可加重原发疾病和引起多器官衰竭。已有临床研究证明,鞣酸蛋白酵母散对于儿童腹泻有良好的治疗作用,本实验主要研究鞣酸蛋白酵母散对肠黏膜的保护作用。虽然现在普遍认为番泻叶归大肠经^[10],但是有研究表明,番泻叶致腹泻也可导致空肠黏膜损伤^[11]。蒙脱石散作为临床儿童腹泻治疗的首选药,可恢复、再生肠上皮组织^[4],因此本实验采用蒙脱石散作为阳性对照药,用番泻叶造模来研究鞣酸蛋白酵母散治疗腹泻的作用机制。研究结果表明,虽然

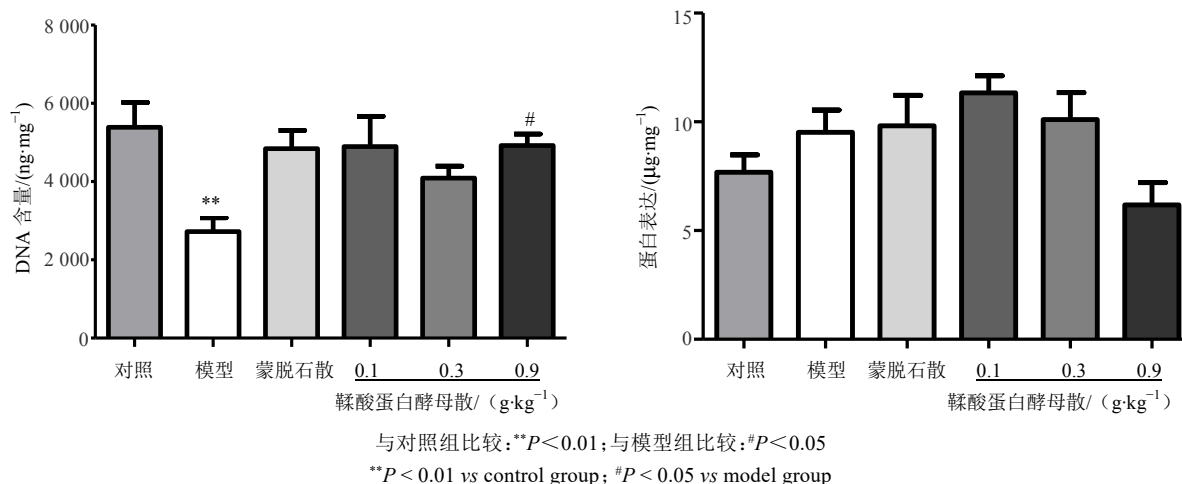


图3 6组大鼠空肠黏膜中DNA和蛋白含量($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 3 DNA and protein content of rat jejunal mucosa in different groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

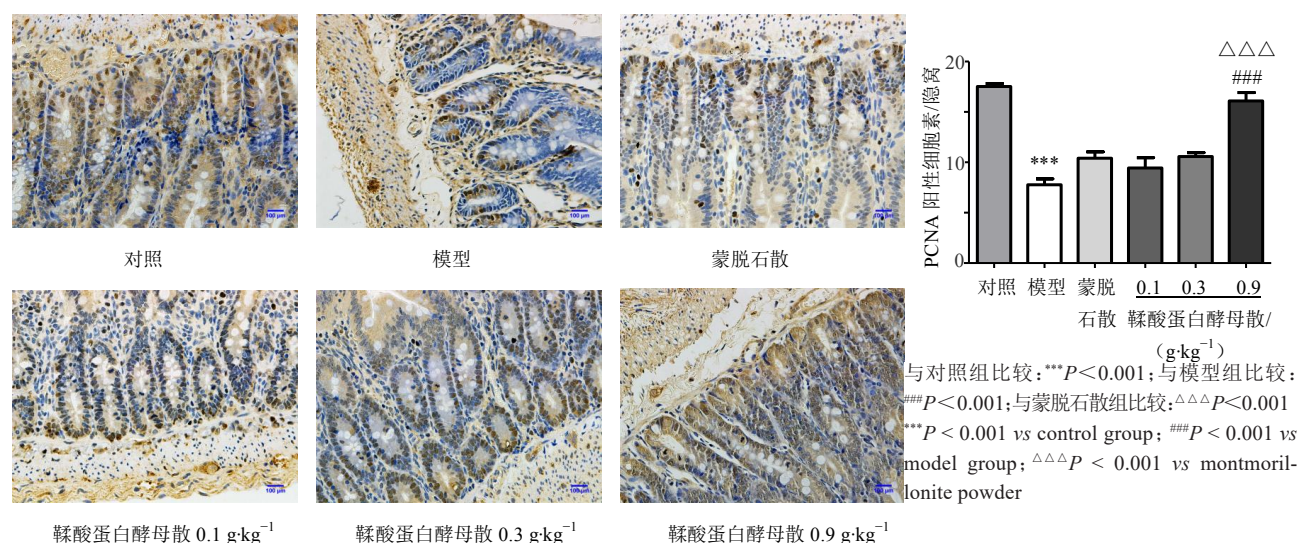


图4 6组大鼠肠隐窝区PCNA表达($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 4 Expression of PCNA in crypts of Rats in different groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

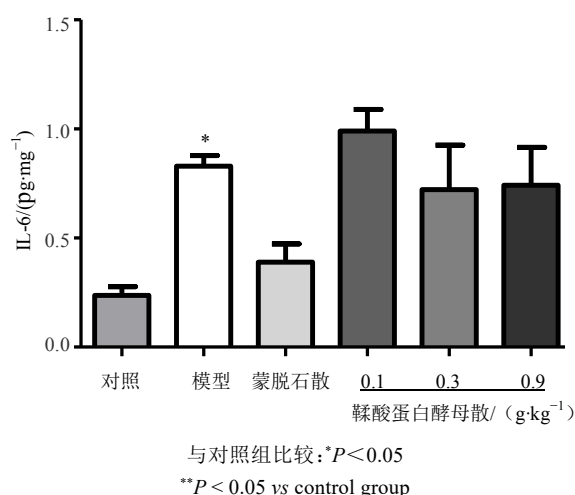


图5 6组大鼠空肠黏膜IL-6表达水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 the expression of IL-6 in jejunal mucosa of Rats in different groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

两者对腹泻的治疗效果相当,但与蒙脱石散比较,鞣酸蛋白酵母散促进肠黏膜损伤修复的作用更加显著。

稀便率和腹泻指数是反映腹泻情况的常用指标,本实验结果显示,在腹泻模型的基础上,分别用高和中剂量(分别相当于人的剂量0.14、0.047 g/kg)的鞣酸蛋白酵母散治疗后,大鼠的稀便率和腹泻指数明显降低。说明中、高剂量的鞣酸蛋白酵母散对大鼠腹泻有良好的治疗效果。既往大量研究结果表明,严重腹泻时可出现小肠黏膜屏障受损。具体变现为肠黏膜水肿,光镜下可观察到肠绒毛结构损坏,固有层分离,甚至出现肠黏膜上皮细胞坏死、脱落^[8]。本实验病理切片结果显示,中、高剂量的鞣酸蛋白酵母散能减少腹泻引起的黏膜损伤,小肠绒毛固有层分离,肠上皮细胞排列紊乱,保护肠黏膜。PCNA为DNA多聚酶的辅酶,主要表达于肠隐窝区,与DNA合成和细胞增殖密切相关,其表达水平可反映肠黏膜的增殖情况。以往研究表明与正常大鼠比较,腹泻模型大鼠小肠黏膜PCNA水平降低,表明肠黏膜增殖受损^[12]。本实验结果显示高剂量的鞣酸蛋白酵母散治疗后大鼠肠隐窝区PCNA的表达增加,同时肠黏膜组织中DNA含量增加,说明鞣酸蛋白酵母散可能通过影响肠黏膜增殖减轻肠黏膜损伤。IL-6是一个与免疫相关的多效的细胞因子,已有研究表明肠黏膜损伤后能诱导IL-6的产生,从而刺激肠上皮细胞增殖和肠黏膜修复^[13]。实验结果显示,鞣酸蛋白酵母散治疗后,肠黏膜组织中IL-6水平有降低的趋势,表明鞣酸蛋白酵母散可能对大鼠肠黏膜炎症反应有一定的减缓作用。综上所述结果表明,鞣酸蛋白酵母散对幼年大鼠腹泻有良

好的治疗作用,且能保护肠黏膜,减轻肠黏膜损伤,促进肠黏膜增殖和修复,同时减轻肠黏膜炎症反应且其治疗效果与蒙脱石散相当。

鞣酸蛋白酵母散为复方制剂,已有研究表明,其在肠内经胰蛋白酶分解,缓慢释放出鞣酸,使肠黏膜受损部位表层蛋白质沉淀,形成一层牢固的蛋白保护膜。其发挥治疗作用的可能机制是鞣酸蛋白口服后能在受损肠黏膜表面沉淀形成一层保护膜,降低了肠黏膜刺激,减轻了炎症渗透,阻止肠黏膜进一步受损,从而发挥肠黏膜保护作用。

参考文献

- [1] Zipursky A, Wazny K, Black R, et al. Global action plan for childhood diarrhoea: developing research priorities: report from a workshop of the programme for global paediatric research [J]. J Glob Health, 2013, 3(1): 010406.
- [2] 张 扬, 全淑燕, 曾力楠, 等. 全球现有儿童腹泻临床实践指南的循证评价 [J]. 中国药房, 2018, 29(8): 1109-1115.
- [3] 胡煌星, 胡利群. 鞣酸蛋白酵母散治疗小儿腹泻的临床效果观察 [J]. 北方药学, 2016, 13(11): 58-59.
- [4] 孙建兰, 佟建宁. 鞣酸蛋白酵母散(度来林)治疗婴幼儿腹泻的临床疗效分析 [J]. 中华临床医师杂志, 2016, 10(4): 593-595.
- [5] 王晓岩. 度来林分段治疗儿童腹泻安全有效 [J]. 中国社区医师, 2012, 28(32): 9.
- [6] 刘 洋, 向丽华, 孙 刚, 等. 五苓散对腹泻模型大鼠结肠AQP4及AQP4mRNA表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(5): 547-549.
- [7] 梁莉婕, 焦立波, 高 明. 建立动物腹泻模型的常用药物及方法的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(8): 1687-1689.
- [8] 黄祖雄, 叶礼燕, 郑智勇, 等. 谷氨酰胺对慢性腹泻幼鼠肠黏膜修复的影响 [J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(5): 368-372.
- [9] Sukhotnik I, Nissimov N, Ben Shahr Y, et al. Fenofibrate reduces intestinal damage and improves intestinal recovery following intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat [J]. Pediatr Surg Int, 2016, 32(12): 1193-1200.
- [10] 郎秀状, 丁 望. 番泻叶的研究概况 [J]. 实用医技杂志, 2005, 12(5): 1294-1295.
- [11] 刘素芳. 野罂粟水煎剂对番泻叶致泻小鼠止泻作用的机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [12] 赵秀军, 李艳丽, 赵 昱, 等. 复方双苓止泻散对腹泻模型大鼠小肠黏膜PCNA mRNA表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2876-2877.
- [13] Kuhn K A, Manieri N A, Liu T C, et al. IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114195.