

益气健脾法对大鼠慢性溃疡性结肠炎 NF- κ B 信号转导通路的实验研究*

王亚梅 刘春慧 张志芳 王雄耀 张锁[※]

(内蒙古医科大学中医学院, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要:目的 益气健脾法对慢性溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜上皮组织 NF- κ B 蛋白因子表达的影响, 阐述补气健脾法对慢性溃疡性结肠炎的作用机制。方法 采用葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)自由灌喂的方式建立 UC 的模型, 用蒸馏水配制浓度为 4% 的 DSS 溶液, 放到饮水瓶中自由饮用, 连续用药 2 周, 造模成功后分别给予益气健脾法中药煎剂高中低剂量组, 西药美沙拉嗪组不同方法进行干预。结果 模型组大鼠结肠组织 NF- κ B 因子的表达均明显高于正常组($P < 0.01$); 健脾益肠散高、中剂量组结肠组织 NF- κ B 因子表达均较模型组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 益气健脾法低剂量组 NF- κ B 因子表达亦低于模型组($P < 0.05$); 益气健脾法中剂量组对 NF- κ B 的影响与美沙拉嗪组比较差异不显著, 但明显优于低剂量组($P < 0.05$)。而健脾益肠法的高剂量组 NF- κ B 蛋白表达明显低于中剂量组及西药组($P < 0.05$)。结论 (1) 益气健脾法对溃疡性肠黏膜免疫的保护作用可能与结肠组织的 NF- κ B 因子表达有关; (2) 益气健脾法治疗溃疡性结肠炎效果显著, 优于西药组, 值得临床推广应用。

关键词: 益气健脾; 溃疡性结肠炎; 中医药疗法

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2020.01.050

文章编号: 1672-2779(2020)-01-0121-03

The method of invigorating qi and invigorating spleen in treating chronic ulcerative colitis in rats Experimental study on NF- κ B signal transduction pathway

Wang Ya mei Zhang Zhifang Liu Chunhui

Abstract: Objective to investigate the effect of invigorating spleen and qi on the expression of NF- κ B protein in colonic epithelial tissues of rats with chronic ulcerative colitis, and to elucidate the mechanism of invigorating spleen and qi on chronic ulcerative colitis. **Methods** using dextran sodium sulfate (dextran sulfate sodium, DSS) free filling and feeding way of UC model is set up, the concentration of 4% DSS solution with distilled water, into the water in the bottle drink freely, use two consecutive weeks, after the success of the building were given qi spleen method Chinese medicine medicinal broth including dose group, western medicine beauty salad oxazine groups of different intervention methods. **Results** NF- κ B protein and expression in colon tissues of the model group were significantly higher than those of the normal group ($P < 0.01$). The expression of colonic protein nf- κ b in the high-dose and medium-dose groups was lower than that in the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of NF- κ B protein in the low dose group was lower than that in the model group ($P < 0.05$). The effect of the medium dose group on NF- κ B was not significantly different from that of the mesalazine group, but was significantly better than that of the low dose group ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B protein in the high-dose group was significantly lower than that in the medium-dose group and the western medicine group ($P < 0.05$). **Conclusion** 1. The protective effect of invigorating qi and strengthening spleen on UC intestinal mucosal immunity may be related to the protein nf- κ b and gene expression in colon tissues. 2.

Keywords: invigorating qi and strengthening spleen; Ulcerative colitis; The doctor of traditional Chinese medicine treatment

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 又称慢性非特异性溃疡性结肠炎或特发性溃疡性结肠炎, 是一种常见的慢性肠道疾病, 发病部位主要在结肠的黏膜及黏膜下层, 呈连续性弥漫性分布, 也可累及直肠和乙状结肠^[1]。主要发病人群是 20~50 岁, 没有明显的性别差

异。临床上主要以, 腹痛、腹泻、里急后重、脓血便为主要的临床表现, 本病轻重不等, 缓解期与发作期交替进行, 具有治愈率低, 反复发作等特点, 被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一, 其病因和发病机理以及对本病的治疗一直是学者们研究的热点^[2]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 60 只, 体质量 180~220 g。由内蒙古医科大学实验动物中心提供。动物许可证号 SYXK (蒙) 2015-0001。

1.1.2 实验仪器 倒置荧光显微镜 (Olympus IX73-U), 石

* 基金项目: 内蒙古自治区教育厅高等教育基金项目 [No. NJZY171117]; 内蒙古自治区教育科学研究“十三五”规划课题 [No. NGIGH2018270]; 中医高等教育教学临床教学研究课题 [No. 2017047]; 内蒙古医科大学青年创新基金 [No. YKD2016QNCX009]; 内蒙古医科大学教学改革项目 [No. NYIXGG2017073]

※通讯作者: 925795038@qq.com

蜡切片机(德国莱卡 RM2235), 生物组织智能脱水机(德国莱卡 TKY-TSD), HE 自动染色机(德国莱卡 ST4020)。

1.1.3 实验试剂 DSSS(美国 sigma 公司, 批号: P2297), 无水乙醇(天津市申泰化学试剂有限公司, 批号: 161006, 广东省精细化学品工程技术研究中心 18101D), NF- κ B 抗体(昆泰锐技术有限公司, 批号: SC-113), SABC 免疫组化试剂(武汉博士德生物工程有限公司, 批号: SA1022)。

1.1.4 实验药物 黄芪 40 g, 党参 15 g, 白术 15 g, 柴胡 10 g, 黄连 6 g, 白芍 10 g, 五味子 10 g, 防风 9 g, 陈皮 9 g, 姜炭 6 g, 茯苓 15 g, 败酱草 15 g, 大血藤 10 g, 木香 10 g, 当归 10 g, 三七 3 g, 鸡内金 10 g。由内蒙古医科大学中医综合实验室缩成 1 mL 含有生药 5 g, 10 g, 15 g。高中低剂量均足量备药, 广口瓶分装, 4℃冰箱保存, 使用前温水预热。

1.2 试验方法

1.2.1 模型的制备与分组 把 60 只 SD 大鼠随机选取 10 只作为空白对照组, 正常饮水, 其余 50 只通过自由饮的方式建立 UC 的模型, 用蒸馏水配制浓度为 4% 的 DSS 溶液, 放到饮水瓶中自由饮用, 连续用药 2 周, 2 周后分别在空白组和造模组分别抽取 2 只 SD 大鼠取结肠组织, 肉眼观察结肠损伤情况, 确定模型是否复制成功。确定成功后如(图 1 所示), 停用 DSS 溶液, 把其余 50 只 SD 大鼠分为 5 组, 分别为美沙拉嗪组、模型组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组, 每组 10 只^[3-5]。

1.2.2 给药方法 造模第 2 天起开始灌胃给药。益气健脾方高、中、低剂量组每日根据临床等效剂量的 15, 10, 5 倍(180, 120, 60 g·kg⁻¹) 给药, 美沙拉嗪组每只给予剂量为 0.3 g·kg⁻¹ 溶液, 模型组给予等体积量生理盐水, 空白组常规饲养, 连续给药 4 周。

2 观察指标

2.1 一般情况 观察大鼠的体重毛色、饮食、粪便等情况, 开始造模与处死前进行称重, 观察体质量的变化情况, 毛色的变化, 饮食量有无增减, 粪便有无黏液脓血等。

2.2 HE 染色 观察大鼠结肠组织病理切片将大鼠处死, 开腹取距离肛门 8 cm 处结肠组织, 经 PBS 清洗后迅速将用 4% 甲醛固定 12 h, 脱水, 石蜡包埋, 切片(厚度为 4 μ m), HE 染色观察大鼠结肠组织的病理改变。

2.3 统计学方法 使用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析。

所有数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐同时用 LSD 法方差不齐时用 Tamhane's T2 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠的一般情况和结肠组织损伤程度评分(CM-DI) 自造模后每天观察各组大鼠精神状态、毛发状态、饮水量、进食量等一般情况。给药结束后处死大鼠, 肉眼观察结肠组织缺损等情况评价 CMDI。0 分: 无损伤; 1 分: 轻度充血、水肿, 表面光滑, 无糜烂或溃疡; 2 分: 充血肿, 黏膜粗糙呈颗粒状, 有糜烂或肠粘连; 3 分: 高度充血水肿, 黏膜表面有坏死及溃疡形成, 溃疡最大纵径 <1 cm, 肠壁增厚或表面有坏死及炎症; 4 分: 在 3 分基础上溃疡最大纵径 1 cm, 或全肠壁坏死。

3.2 病理的检测 结肠组织的病理学改变: 空白组可见大鼠结肠组织结构完整, 血管清晰, 绒毛整齐规律, 未见炎症细胞及溃疡形成, 模型组可见结肠组织结构破坏, 绒毛不同程度消失, 肠壁变薄, 黏膜和黏膜下层出现不同程度炎性细胞浸润, 充血、水肿、糜烂及溃疡, 益气健脾方治疗组较模型组炎性细胞减少, 溃疡面缩小或愈合, 黏膜及黏膜下组织修复^[7]。

3.3 免疫组化检测 模型组结肠 NF- κ B 表达明显高于空白组 (P<0.01); 益气健脾方对各治疗组结肠组织 NF- κ B 表达较模型组明显降低 (P<0.05); 益气健脾方各治疗组之间有显著差异, 益气健脾方的高剂量组 NF- κ B 表达较中剂量组降低明显 (P<0.05); 益气健脾方的中剂量组与西药美沙拉嗪组 NF- κ B 表达无显著差异。表明益气健脾方的用药剂量与治疗效果有一定关系, 剂量越高治疗效果越好。见表 1。

表 1 健脾益肠散对 UC 大鼠结肠 NF- κ B 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	剂量(g·kg ⁻¹)	NF- κ B/A
空白组	5	-	0.30±0.05
模型组	5	-	0.56±0.11 [◇]
美沙拉嗪组	5	0.3	0.36±0.07 [▽]
益气健脾方组(高)	5	180	0.34±0.06 [▲]
益气健脾方组(中)	5	120	0.37±0.05 ^{▲▲}
益气健脾方组(低)	5	60	0.43±0.09 ^{▽▲}

注: 与正常组比较[◇]P<0.01; 与模型组比较[▽]P<0.05, [▲]P<0.01; 与健脾益肠散高剂量组比较^{▲▲}P<0.05

4 讨论

目前溃疡性结肠炎是消化系统难治性疾病之一, 且随着生活水平及诊疗条件的进步, 本病在我国的发生率呈明显增高的趋势, 严重的情况下会影响患者的

生活质量, 中西医在治疗此病方面均有一定的优势, 但都难以彻底治愈, 因此, 后期的巩固治疗就显得尤为重要。而西药的副作用较大, 又不适合作为溃疡性结肠炎的维持治疗药物, 故中医药对本病的疗效越来越受到大多数学者的认可和重视, 相对中医在辨证论治的基础上治疗效果更好一些, 针对性更强, 疗效更明显, 复发率相对较低。现代医学认为溃疡性结肠炎的发病与免疫功能异常、感染、菌群失调以及遗传等因素关系密切。具体的病因尚不明确, 但在溃疡性结肠炎中检测到 NF- κ B 因子, 研究发现溃疡性结肠炎患 UC 大鼠的炎症吸收和组织修复, 改善结肠黏膜受损病变结肠黏膜组织 NF- κ B 表达水平显著增高, 表明 NF- κ B 在肠组织的表达与 UC 病情严重程度有关。提示结肠组织 UC 的信号转导与结肠溃疡发生有密切的关系, 当 NF- κ B 因子被激活时, 可能会促使一些炎症因子的释放, 导致结肠黏膜的损伤。因此有效的阻断 NF- κ B 因子的信号转导的通路或抑制 NF- κ B 的活性有利于结肠组织溃疡的修复与愈合, 降低 NF- κ B 因子在结肠组织的表达^[8]。在本实验研究中发现由 DSS 诱导的 UC 模型中 NF- κ B 因子的表达明显升高, 而健脾益气的高剂量组的 NF- κ B 的表达水平较其他实验组明显下降, 所以健脾益气法的高剂量组的治疗效果明显优越于中、低剂量组。本实验在使用 DSS 诱导大鼠 UC 模型中, 发现 NF- κ B 表达阳性细胞数量增多, 进一步检测结肠组织中 NF- κ B 的表达同样呈升高的趋势, 提示 NF- κ B 信号通路与溃疡性结肠炎发病有着密切的关系。因此有效治疗溃疡性结肠炎, 以及预防它的复发, 就是要阻断 NF- κ B 通路, 抑制 NF- κ B 细胞因子的活性, 使促炎因子释放减少或消失。溃疡性结肠炎属于中医“休息痢”“久痢”“泄泻”范畴。溃疡性结肠炎在缓解期主要表现为泄泻, 脾虚是其主要原因, 脾气亏虚, 运化失职, 湿热内侵, 湿热稽留, 客于肠腑, 蕴于大肠, 通降不利, 气血壅滞, 脂络受损, 发为脓血便, 正如《景岳全书·泄泻》所云: “泄泻之本, 无不由于脾胃”。常用健运脾胃的方法治疗, 对于脾胃气虚之证, 治疗主要以益气健脾、升清祛湿为主益气健脾法是以《内外伤辨惑论》升阳益胃汤为基础方, 结合现代医学对溃疡性结肠炎的机理研究, 以及中药药理研究, 化裁组方。适用于脾胃虚弱, 湿热蕴肠的本虚标实证。方中以黄芪、党参、白术益气健脾益气升举脾气, 黄连清热燥湿; 防风、柴胡祛风胜湿止痢, 风药其性多燥, 故在健脾基础上可配风药以助升阳除湿止泻, 配伍五味子、白芍、当归养血敛阴防止

祛风药物之燥伤阴, 三七化瘀祛腐, 败酱草、大血藤清热止痢, 配以陈皮理气和血, 气行则血行, 血行则痢止, 炮姜炭温运脾阳, 甘草调和诸药, 且与白芍配伍可缓腹痛之急。鸡内金健脾和胃, 助脾之运化。全方能够健脾益气, 解毒排脓, 养血消壅, 去湿止泻。标本兼顾。本实验表明益气健脾方能够促进大鼠结肠溃疡愈合, 有效抑制 NF- κ B 转录因子活化作用, 降低 NF- κ B 表达, 且高剂量组的治疗效果优于低剂量组和中剂量组。



模型组 空白组
图1 溃疡性结肠炎模型的肉眼观察

参考文献

- [1] 张瑞芳, 陈朝晖, 刘漪沧, 等. 溃疡性结肠炎的发病机制及其治疗进展[J]. 生命的化学, 2018, 38(2): 241-249.
- [2] Dignass A, Eliakim R, Magro F, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. J Crohns Colitis, 2012, 6(10): 965-990.
- [3] 曹明泽, 王旭荣, 王磊, 等. 小鼠溃疡性结肠炎模型的建立与评价[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(1): 171-175.
- [4] 衡宇, 李晰, 孙涛, 等. 葡聚糖硫酸钠自由饮用与灌胃诱导小鼠溃疡性结肠炎模型的对比研究[J]. 中国药师, 2017, 20(4): 603-606.
- [5] 崔国宁, 刘喜平, 董俊刚, 等. 溃疡性结肠炎模型建立方法研究进展[J]. 今日药学, 2018, 28(4): 280-284.
- [6] 刘杰民, 蔺晓源, 王敏, 等. 健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠 MyD88 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 141-143.
- [7] 张忠, 程富胜, 贾宁, 等. 小鼠溃疡性结肠炎模型的建立及病理组织学比较[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(6): 69-72.
- [8] 时美静, 李睿岩, 张玉彬. 中药治疗溃疡性结肠炎所涉信号通路研究进展[J]. 药学进展, 2016, 40(8): 610-618.
- [9] 王鹏程, 赵珊, 冯健, 等. 基于 NF- κ B 信号通路的中药抗溃疡性结肠炎研究进展. 中草药, 2015, 46(10): 1556-1557.
- [10] 崔世超, 越冬. 溃疡性结肠炎的中医治疗思路[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(7): 1381-1383.
- [11] 张声生, 沈柳洪. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3587.

(本文编辑: 张文娟 本文校对: 刘春慧 收稿日期: 2019-05-07)