

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 07. 020

加味白头翁汤灌肠液治疗活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠疗效观察

葛曼青¹, 巫玉兰¹, 陈 轩^{2△}

(1. 西南医科大学附属中医医院肛肠科, 四川泸州 646000;
2. 西南医科大学附属中医医院胃肠外科, 四川泸州 646000)

摘 要:目的 观察比较加味白头翁汤灌肠液与其他灌肠药物治疗活动期湿热型溃疡性结肠炎的大鼠动物模型的效果, 评价该中药汤剂的疗效。方法 (1) 分组与灌肠方法: 健康 10 周龄无特殊病原体级 SD 大鼠共 110 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 对照组(D 组)10 只, 模型组(M 组)10 只, 加味白头翁汤灌肠组(Z1、Z3 组)30 只, Z1、Z3 组各 15 只, 美沙拉嗪灌肠组(X1、X3 组)30 只, X1、X3 组各 15 只, 生理盐水灌肠组(S1、S3 组)30 只, S1、S3 组各 15 只。在高脂、高糖及辛辣饮食喂养基础上, 使用二硝基氯苯-乙酸复合法建立湿热型溃疡性结肠炎大鼠模型, Z1、Z3 组分别给予加味白头翁汤灌肠液灌肠 1、3 周, X1、X3 组分别给予美沙拉嗪灌肠液灌肠 1、3 周, S1、S3 组分别给予生理盐水灌肠 1、3 周, 每日 1 次。(2) 标本采集: D 组和 M 组心脏采血 5 mL, 行转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、白细胞介素(IL)-8 和 IL-13 检测; 截取肛门病变处 8 cm 结肠放入 4% 多聚甲醛标本瓶, 标本行石蜡包埋切片, 并予以 HE 染色检测; Z1、X1、S1 组治疗 1 周后处死, 采集标本; Z3、X3、S3 组治疗 3 周后处死, 采集标本。比较各组 TGF- β 1、IL-8 和 IL-13 变化情况, 并进行统计分析。结果 (1) 结肠病理组织活检提示, 加味白头翁汤灌肠液治疗活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜明显修复, 结肠黏膜损伤指数明显改善。(2) 造模后, M 组大鼠血清中 TGF- β 1、IL-8 水平较 D 组明显升高, IL-13 较 D 组明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 治疗后, Z1 组大鼠血清中 TGF- β 1、IL-8 水平较 X1、S1 组明显下降, IL-13 明显升高, Z3、X3 组大鼠血清中 TGF- β 1、IL-8 水平较 S3 组明显下降, IL-13 明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); Z3 组与 X3 组大鼠血清中 TGF- β 1、IL-8、IL-13 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 加味白头翁汤灌肠液通过对促炎因子 IL-8、TGF- β 1 的抑制, 抑炎因子 IL-13 水平升高, 可改善肠道病变局部黏膜的血液循环, 促进溃疡修复, 对活动期湿热型溃疡性结肠炎有较好的治疗作用。

关键词:加味白头翁汤灌肠液; 活动期湿热型溃疡性结肠炎; 疗效

中图法分类号: R25; R574

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)07-0934-05

A study on Modified Pulsatilla Enema in Treating Rats of Active Damp-heat Ulcerative Colitis

GE Manqing¹, WU Yulan¹, CHEN Xuan^{2△}

(1. Department of Anorectal Surgery, Southwest Medical University Affiliated TCM Hospital, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of General Surgery, Southwest Medical University Affiliated Hospital, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** In the rat model of active damp-heat ulcerative colitis, we observed the curative effect of modified Pulsatilla enema on the active phase of the animal model and evaluated the curative effect of the decoction of the traditional Chinese medicine. **Methods** A total of 110 healthy 10-week-old SPF SD rats were randomly divided into 5 groups: 10 in the control group (D), 10 in the model control group (M), 15 in each modified Pulsatilla enema treatment group (Z1, Z3), 15 in each Mesalazine enema treatment group (X1, X3), and 15 in each Salaline enema treatment group (S1, S3) respectively after the model of rats of ulcerative colitis in active stage with damp-heat symptom were built with feeding the rats with high-fat, high-sugar and spicy diet based on Dinitrochlorobrnzene + Acetic-acid, the rats in Z1 and Z3 groups were given enema of Pulsatilla decoction enema for 1 week, 3 weeks, X1 and X3 groups were given the enema of mesalazine enema for 1 week and 3 weeks, and S1 and S3 groups were given saline enema for 1 week and 3 weeks respectively. The above enema was given once daily. Specimen collection; the rats of D and M group were collected 2 mL blood of heart for detection of TGF-1, IL-8 and IL-13. The abdominal cavity was opened immediately after the blood was drawn, and the antrum of 8 cm lesion in the anus was intercepted. The specimen was filled into a sample bottle with a fixed solution and embedded in paraffin, sliced, and stained with HE. After 1 week of treatment

blood samples and colon tissues were collected from group Z1, X1 and S1. The specimens were collected with the same way from group Z3, X3 and S3 after treatment for 3 weeks. Specimens were compared and statistically analyzed for the expression of TGF- β 1, IL-8 and IL-13. **Results** (1) In the modified Pulsatilla enema treatment of damp-heat ulcerative colitis in rats, colon pathological biopsy showed that colon mucosa was significantly repaired, colon mucosa damage index significantly improved, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). (2) Effect of the Pulsatilla enema on serum inflammatory cytokines in rats with damp-heat ulcerative colitis; after modeling, the levels of TGF- β 1 and IL-8 in serum of M group were significantly increased and IL-13 decreased significantly compared to D group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The serum levels of TGF- β 1 and IL-8 in group Z1 were significantly lower than those in group X1 and S1 and IL-13 significantly increased ($P < 0.05$). The levels of TGF- β 1 and IL-8 in Z3 and X3 groups were significantly lower than those in S3 group and IL-13 increased significantly ($P < 0.05$). The level of TGF- β 1, IL-8 and IL-13 in Group Z3 had no significantly difference compared to group X3 ($P > 0.05$). **Conclusion** Modified Pulsatilla enema can effectively inhibit proinflammatory cytokines IL8 and TGF- β 1, increase inflammation inhibitor IL-13, improve local blood circulation of intestinal mucosal lesions, enhance ulcer repairment, so it has a good curative effect on damp-heat ulcerative colitis.

Key words: modified pulsatilla enema; active damp-heat ulcerative colitis; efficacy

溃疡性结肠炎属于炎症性肠病,其主要病理特点是溃疡形成及慢性炎性反应,常始于左半结肠,可向结肠近端乃至全结肠以连续方式逐渐进展,主要侵犯黏膜及黏膜下层,呈节段性和弥漫性分布^[1]。溃疡性结肠炎发病年龄及性别无明显差异,临床特点有持续性或反复性黏液血便、腹痛,伴有不同程度的全身症状,但仍有少数患者只表现为便秘或无血便症状,临床症状轻重不一。溃疡性结肠炎发病机制较复杂,病因至今不明。现代医学研究表明,溃疡性结肠炎多与免疫因素、炎性反应和自由基损伤等相关^[2]。抗炎因子的过度表达及抑炎因子水平下降导致免疫反应过强,是溃疡性结肠炎发病的一个较为重要的因素^[3]。

祖国医学理论将溃疡性结肠炎纳入“泄泻”“便血”“痢疾”范畴,其病因多为饮食不节或脾胃亏虚,或情志忧虑等导致脾胃受损、水谷运化失司、滋生湿热,内蕴于肠腑而致病症反复发作。在临床治疗中,采用中药汤剂进行灌肠具有较独特的效果^[4],其中白头翁汤具有清热解毒,燥湿凉血止痢之功效,对溃疡性结肠炎可起到控制感染、增加溃疡局部营养供给、改善循环、促进修复的作用^[5]。本研究建立湿热型溃疡性结肠炎大鼠动物模型,采用中西医方法进行治疗,通过检测试验动物血清转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、白细胞介素(IL)-8和IL-13水平变化,并与病变结肠组织的病理活检结果对照,了解建模前后及动物模型在治疗的不同时间段的炎性反应程度和免疫调节变化,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物制备 (1)中药:西南医科大学附属中医医院加味白头翁汤灌肠液:白头翁 20 g,秦皮 15 g,黄连(酒)12 g,黄柏 20 g,黄芩(酒)10 g,川赤芍 10 g,当

归 12 g,木香 10 g,甘草 5 g。(2)西药:美沙拉嗪灌肠液(莎尔福,德国 Falk 公司);生理盐水(江苏强生生物科技有限公司)。

1.1.2 仪器与试剂 二硝基氯苯(国药集团化学试剂有限公司),乙酸(天津市瑞金特化学品有限公司),病理标本固定液,邻甲联苯胺试剂,过氧化氢,冰乙酸,蜂蜜,猪油,大鼠血清 IL-8、IL-13、TGF- β 1 酶联免疫吸附试验检测试剂盒,酶标仪 550 型(美国 BIO-RAD),洗板机 MW-12A/t(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),微量高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),恒温培养箱(MIR-162-PC 日本松下),电子天平(常州万泰天平仪器有限公司)。

1.1.3 动物 无特殊病原体(SPF)级 SD 大鼠 110 只,10 周龄,雌雄各半,质量(180 $\pm$ 10)g,购于西南医科大学动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 110 只大鼠随机分为 5 组:对照组(D 组)10 只,模型组(M 组)10 只,加味白头翁汤灌肠组(Z1、Z3 组)30 只,Z1、Z3 组各 15 只,美沙拉嗪灌肠组(X1、X3 组)30 只,X1、X3 组各 15 只,生理盐水灌肠组(S1、S3 组)30 只,S1、S3 组各 15 只。

1.2.2 模型制备 在高糖、高脂及辛辣饮食喂养基础上,使用二硝基氯苯-乙酸复合法建立湿热型溃疡性结肠炎大鼠动物模型。建模方法:大鼠予以普通饲料喂养的同时给予高糖、高脂及辛辣饮食(加用 200 g/L 蜂蜜水自由饮用,按大鼠质量 15 g/kg 油脂隔日灌服,并予乙醇浓度为 56°的白酒按大鼠质量 20 mL/kg 隔日灌服,共灌服 20 d)。观察已建立的湿热型大鼠模型 1 周,待模型稳定;提起其尾巴将其倒立,用直径 3 mm、长 15 cm 的硅胶管由肛门插入 8 cm,灌入 0.5 mL 二硝基氯苯(0.04 mmol/L),其后继续将大鼠

保持倒立 3 min,并轻揉肛门,以避免药液溢出;2 周后于模型大鼠的同部位注入乙酸 2 mL。

1.2.3 治疗方法 造模成功后,观察 3 d,明确模型稳定后进行治疗。Z 组采用加味白头翁汤灌肠液灌肠(药物剂量按照人与试验大鼠用药等效剂量换算为 1.35 mL/100 g),X 组采用美沙拉嗪灌肠液灌肠(药物剂量均按照人与试验大鼠用药等效剂量换算为 0.55 mL/100 g),S 组采用生理盐水灌肠(1.35 mL/100 g)。灌肠用直径 3 mm、长 15 cm 的硅胶管由肛门插入 8 cm,其后将大鼠保持倒立 3 min,并轻揉肛门,以避免药液溢出。灌肠每日进行一次,Z1、X1、S1 组治疗 1 周,Z3、X3、S3 组治疗 3 周。

1.2.4 标本采集 分别给予各组大鼠 0.4 mL/100 g 的水合氯醛腹腔注射麻醉,暴露心脏,采血针穿刺并接 5 mL 负压采血管,收集血液进行 TGF-β1、IL-8 和 IL-13 检测;截取肛门病变处 8 cm 结肠放入 4%多聚甲醛标本瓶,标本行石蜡包埋切片,并予以 HE 染色检测。

1.2.5 观察指标 比较各组结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分;观察各组病理组织活检情况及各治疗组大鼠血清 IL-8、IL-13、TGF-β1 水平变化。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;样本均数间的比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$

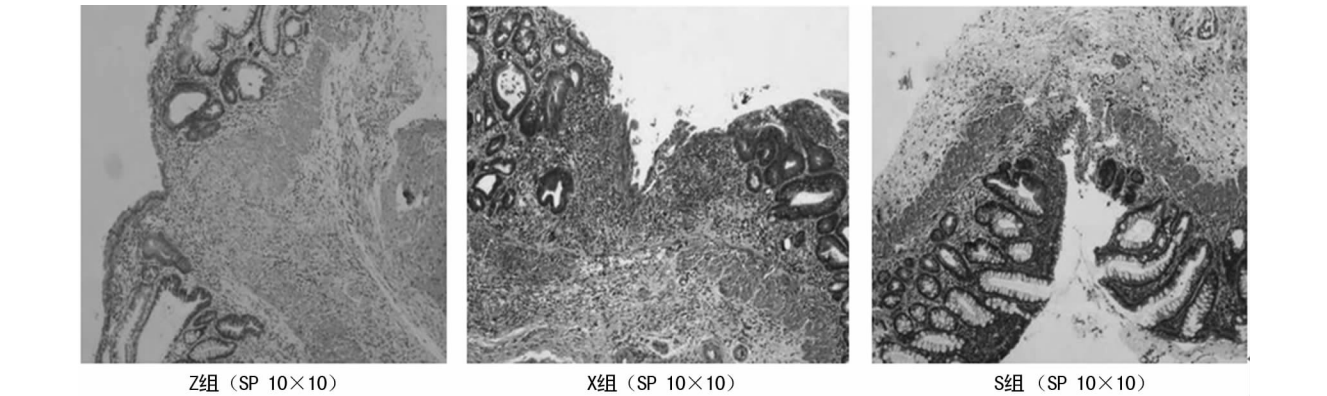
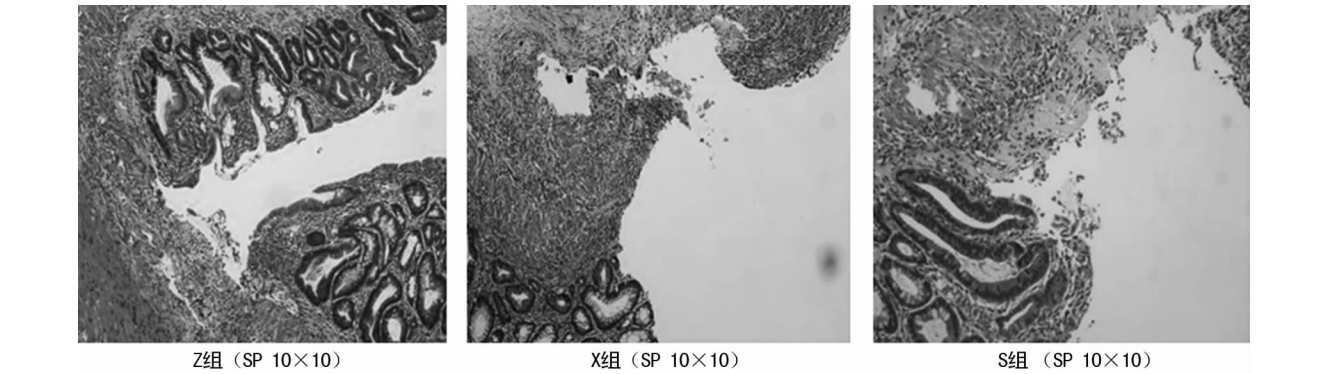
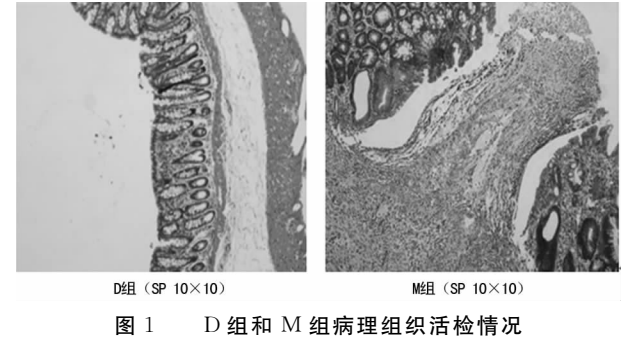
为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 D 组和 M 组 CMDI 评分比较 D 组 CMDI 评分(0.500 ± 0.483)分,M 组 CMDI 评分(4.670 ± 0.507)分,D 组和 M 组 CMDI 评分比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 3 个治疗组与 M 组 CMDI 评分比较			
组别	治疗时间	<i>n</i>	CMDI 评分($\bar{x} \pm s$,分)
Z1 组	1 周	14	2.01 ± 0.499
Z3 组	3 周	11	1.27 ± 0.547
X1 组	1 周	13	3.45 ± 0.555
X3 组	3 周	10	1.70 ± 0.555
S1 组	1 周	11	4.36 ± 0.674
S3 组	3 周	8	4.03 ± 0.635
M 组		9	4.67 ± 0.507

注:Z1 组有 1 只,Z3 组有 4 只,X1 组有 2 只,X3 组有 5 只,S1 组有 4 只,S3 组有 7 只,M 组有 1 只大鼠死亡



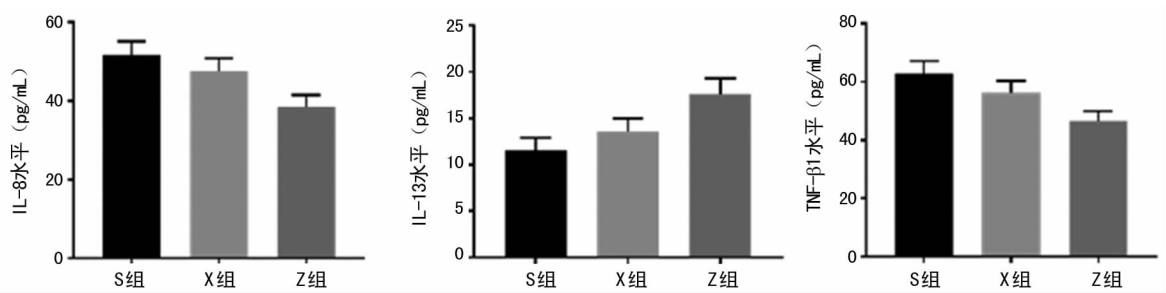


图 4 治疗 1 周后 S、X、Z 组大鼠血清中 IL-8、IL-13、TGF-β1 表达水平

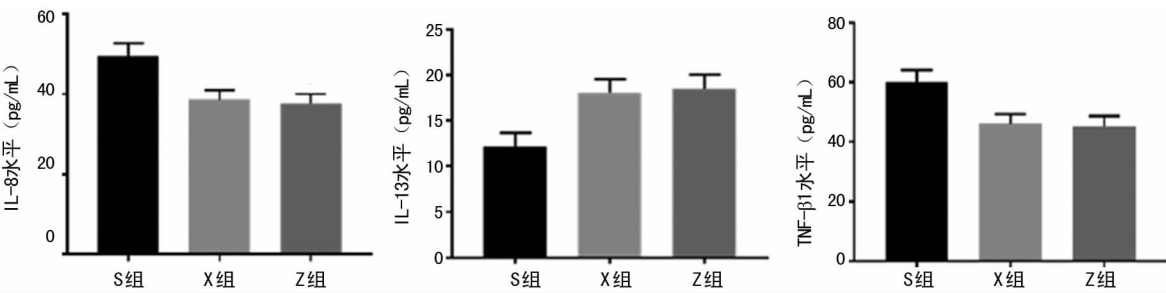


图 5 治疗 3 周后 S、X、Z 组大鼠血清中 IL-8、IL-13、TGF-β1 表达水平

2.2 Z 组、X 组、S 组和 M 组 CMDI 评分比较 见表 1。Z1、Z3 组与 M 组 CMDI 评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);X1 组与 M 组 CMDI 评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$),X3 组与 M 组 CMDI 评分比较,差异有统计学意义($P<0.05$);S1、S3 组与 M 组 CMDI 评分比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 HE 染色光镜下观察结果及血清中炎症因子表达情况 活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠动物模型造模成功后,D 组和 M 组病理组织活检情况见图 1,D 组黏膜连续、完整,无糜烂、溃疡及出血灶,腺体排列规则,少量炎性细胞浸润;M 组黏膜缺损、充血水肿、糜烂、溃疡深大,腺体破坏,弥漫性炎性细胞分布。活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠模型造模成功后予以加味白头翁汤灌肠液、美沙拉嗪灌肠液、生理盐水治疗 1、3 周后结肠病理组织活检情况见图 2、3。活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠模型造模成功后予加味白头翁汤灌肠液、美沙拉嗪灌肠液、生理盐水治疗 1、3 周后,大鼠血清中 IL-8、IL-13、TGF-β1 表达水平见图 4、5。

2.4 M 组和 D 组 IL-8、IL-13、TGF-β1 水平比较 见表 2。由表 2 可见,M 组 IL-8、TGF-β1 水平较 D 组明显升高,IL-13 水平较 D 组明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 M 组和 D 组 IL-8、IL-13、TGF-β1 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-8	IL-13	TGF-β1
M 组	9	53.561±2.599	10.055±1.504	65.846±3.875
D 组	10	33.793±2.396	19.319±1.426	44.764±3.285

注:M 组有 1 只大鼠死亡

3 讨 论

在具有肉眼炎性反应表现的溃疡性结肠炎、Crohn's 病的结肠病理组织中,IL-8 蛋白在结肠黏膜中的表达明显高于对照组,其可以诱导中性粒细胞运动至结肠黏膜。溃疡性结肠炎患者电子结肠镜的分级与局部组织的炎性反应及黏膜中 IL-8 的活性相关^[6]。而 IL-13 可抑制炎症因子,同时还能够保护单核细胞和内皮细胞免受炎症介质所致凝血倾向的损伤,其可以减少炎症性肠病患者组织蛋白酶 D 的前体形式。IL-13 作为抗炎因子,临床上可将其应用于衡量炎性反应治疗,如脓毒血症、感染性休克、类风湿关节炎等^[7]。TGF-β1 在炎症肠病的炎性反应活化中起重要作用,能调节上皮细胞的恢复和固有层细胞的功能,其过度表达可导致瘢痕增生和纤维化^[8]。王孝先^[9]在治疗溃疡性结肠炎患者的过程中发现,抑制 TGF-β1 有助于控制溃疡性结肠炎的临床症状。IL-8、IL-13 和 TGF-β1 三者可反映溃疡性结肠炎的严重程度,可作为判断疗效及控制疾病症状的指标。因此,本研究选取血清中 IL-8、IL-13 和 TGF-β1 作为判断药物疗效的指标。

临床上溃疡性结肠炎的治疗仍然是一个难点,对于新发病例,保守治疗仍是首选方案。溃疡性结肠炎的保守治疗主要是药物治疗,包括免疫抑制剂、糖皮质激素、氨基水杨酸制剂、生物制剂等。本研究所用的美沙拉嗪灌肠液(莎尔福,德国 Falk 公司)是 5-氨基水杨酸的新型控释剂,它主要通过阻断白三烯和前列腺素的合成,从而抑制中性粒细胞趋化,其耐受性优于柳氮磺胺吡啶,疗效更佳。但美沙拉嗪灌肠液的制备工艺要求较高,价格较昂贵,对于大多数患者接

受起来经济上有一定困难。而祖国医学对“泄泻”“便血”的研究颇深,《白头翁汤》由白头翁 15 g、黄柏 12 g、黄连 6 g、秦皮 12 g 四味药组方而成,最早出自于《伤寒论》中。有研究表明,白头翁汤发挥药效的主要物质基础是香豆素类、生物碱类、柠檬苦素类和皂甙类化合物^[8]。通过对各化学成分的研究,白头翁汤具有抗炎、抗菌^[9-10]、修复^[11]、免疫调节^[12]、抑制肠管运动^[13]、抗腹泻^[14]等作用。本院根据多年的临床经验,针对溃疡性结肠炎患者,在灌肠液中以“白头翁汤”为基础方加味当归、黄芩、木香等,起到较满意的疗效。本研究在对活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠的治疗中,加味白头翁汤灌肠液组 TGF-β1 和 IL-8 明显降低,而 IL-13 水平升高,通过调整细胞因子紊乱,使这些炎症因子在体内重新达到平衡状态,从而起到治疗效果,这与中医理论中“扶正”“制邪”观点一致。下一步将对加味白头翁汤灌肠液抑制促炎因子的相关信号通路做进一步研究。

参考文献

[1] 孙贵张,卜平,孔桂美. 溃疡性结肠炎免疫学发病机制进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2008,17(4):266-269.

[2] 吕永慧,孙丽红,张丹,等. 肠炎清提高治疗溃疡性结肠炎的临床疗效与实验研究[J]. 中医药学刊,2003,21(7):1103-1106.

[3] 谭彬,赵已未. 溃疡性结肠炎患者血清 IL-13、IL-8 的水平变化及意义[J]. 临床医学工程,2012,19(4):581-582.

[4] 项维. 中药治疗溃疡性结肠炎 52 例临床观察[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2012,26(1):63-64.

(上接第 933 页)

参考文献

[1] ILBAWI A M, ANDERSON B O. Cancer in global health: how to prevention and early detection strategies relate[J]. Sci Transl Med,2015,7(278):278-282.

[2] CHEN J G, ZHANG S W. Liver cancer epidemic in China: past, present and future[J]. Semin Cancer Biol,2011,21(1):59-69.

[3] INAGAKI Y, TANG W, MAKUUCHI M, et al. Clinical and molecular insight into the hepatocellular carcinoma tumour maker desgammacarboxyprothrombin [J]. Liver Int,2011,31(1):22-35.

[4] WENBIN X, YU L L. Elevation of serum and ascites CA125 levels in liver cirrhosis [J]. World Chin J Digestol,2003,11(11):1720-1722.

[5] 陈观尚. 溃疡性结肠炎患者 C 反应蛋白的变化及美沙拉嗪联合白头翁汤灌肠的疗效观察[J]. 广东医学院学报,2011,29(2):147-148.

[6] 周宇,叶文桃,王皓,等. 溃疡性结肠炎患者血浆白介素-13 检测和临床价值[J]. 医师进修杂志,2004,27(17):16-17.

[7] KLEIN M B, YALAMANCHI N, PHAM H, et al. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production[J]. J Hand Surg Am,2002,27(4):615-620.

[8] 朱华旭,丁林生. 白头翁汤剂化学成分的分离研究[J]. 中成药,2006,21(6):313.

[9] 王孝先. 黄芩汤、白头翁汤、葛根芩连汤对肠道菌株抑菌作用的实验观察[J]. 中国中医基础医学杂志,2001,7(1):42-44.

[10] 曹送年. 中药复方及单味药对真菌的抑制作用[J]. 中华医学杂志,2005,50(12):782.

[11] 韩捷. 白头翁汤治疗乙酸诱发大鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(3):38-40.

[12] 陈仲广,李鹏,汪斌. 白头翁汤治疗溃疡性肠炎的临床应用及作用机制研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2013,8(1):94-96.

[13] 吕锦芳,卢文超,宁康健. 白头翁汤对兔离体十二指肠运动性能的影响[J]. 中国中医药科技,2005,12(5):279-280.

[14] 时维静,孙海明,俞浩. 白头翁汤拆方抗腹泻试验研究[J]. 中兽医医药杂志,2007,26(1):30-31.

(收稿日期:2018-11-16 修回日期:2018-12-28)

[5] 蒋正明. 血清肿瘤特异性生长因子检测的临床意义[J]. 检验医学与临床,2012,9(18):2331-2333.

[6] 王国平,李娜萍,吴焕明. 临床病理诊断指南[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2013:42-49.

[7] 胡晓菲,於建鹏,王钢胜. PIVKA-II 和 AFP 在原发性肝癌中的诊断应用价值[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(15):1473-1476.

[8] 张新果,何树光. 血清 TSGF 和 AFP 联合检测在原发性肝癌诊断中的应用价值[J]. 检验医学与临床,2011,8(15):1839-1840.

[9] 齐发梅,魏莲花,周爱花,等. 探讨 TSGF 在 6 种恶性肿瘤诊断中临床应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(2):198-199.

(收稿日期:2018-11-20 修回日期:2019-01-02)