·实验研究·

复方黄柏液对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜的保护作用

李　多,梁　娜,吴　娜,彭　昭
(河北北方学院附属第一医院消化内科,张家口 075000)

[摘要] **目的**:观察复方黄柏液对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)大鼠相关炎性因子及核转录因子-κB(nuclear factor-kappa B,NF-κB)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)蛋白表达的影响,探讨复方黄柏液对大鼠结肠黏膜的保护机制。**方法**:实验动物随机分为空白对照组、模型组、复方黄柏液组,采用免疫复合法制备UC大鼠模型,治疗14 d后,采用ELISA法检测白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumour necrosis factor-α,TNF-α)变化,Western Blot法检测NF-κB和COX-2蛋白表达。**结果**:与空白组对比,模型组IL-6和TNF-α含量升高($P<0.01$),NF-κB和COX-2蛋白表达升高($P<0.01$);与模型组对比,复方黄柏液组中IL-6和TNF-α含量降低($P<0.05$),NF-κB和COX-2蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论**:复方黄柏液对UC大鼠的保护可能通过抗炎作用。

[关键词] 复方黄柏液;溃疡性结肠炎;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子-α;核转录因子-κB;环氧合酶-2
[中图分类号] R975　　[文献标志码] B　　[文章编号] 1003-3734(2021)16-1519-05

Protection of Compound Cortex Phellodendri Fluid on colonic mucosa of rats with ulcerative colitis

LI Duo, LIANG Na, WU Na, PENG Zhao
(*Department of Digestion, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou* 075000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the effects of Compound Cortex Phellodendri Fluid on inflammatory factors, nuclear factor-kappa B (NF-κB) and cyclooxygenase-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) protein expression in rats with ulcerative colitis (ulcerative colitis, UC), and explore the protective mechanism. **Methods**: The experimental animals were randomly divided into blank control group, model group and Compound Cortex Phellodendri Fluid group. The UC rat model was established by immune complex method. After 14 days of treatment, the contents of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were determined by ELISA method. Nuclear factor-κB and cyclooxygenase-2 were determined by Western Blot method. **Results**: Compared with the blank group, the contents of IL-6 and TNF-α and the expression of NF-κB and COX-2 protein in the model group increased, while the contents of IL-6 and TNF-α, and the expression of NF-κB and COX-2 protein in the Compound Cortex Phellodendri Fluid group decreased. **Conclusion**: The protective effect of Compound Cortex Phellodendri Fluid on UC rats may be produced through anti-inflammatory effect.

[**Key words**] Compound Cortex Phellodendri Fluid; ulcerative colitis; interleukin-6; tumor necrosis factor-α; nuclear factor-κB; cyclooxygenase-2

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是消化系统常见病和多发病,是一种累及结肠和直肠的慢性非特异性炎性病变,主要病理改变为黏膜及黏膜下层连续性、弥漫性炎性细胞浸润,隐窝脓肿及溃疡形成,病情迁延会伴有纤维组织增生甚至不典型增生[1]。主要表现为腹痛、腹泻,反复发作黏液脓血

[基金项目] 2020年度张家口市重点研发计划项目(2021090D)
[作者简介] 李多,女,副主任医师,硕士研究生,研究方向:消化系统疾病诊治。E-mail:liduo80@163.com。

便,不易治愈。病因至今未明确,考虑是一个多病因、多阶段、多基因逐渐变异积累的过程。其常与感染、饮食、劳累、自身免疫功能紊乱等致病因素有关。中医药在治疗 UC 中也起到了积极的作用,复方黄柏液是一种常用的中药制剂,临床上使用其灌肠辅助 5-氨基水杨酸制剂治疗 UC,但作用机制不清。研究结果显示,UC 患者血清中白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子-α(tumour necrosis factor-α,TNF-α)的表达升高,另外发现结肠黏膜核转录因子-κB(nuclear factor-kappa B,NF-κB)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)蛋白在疾病进展中具有重要作用[2-3]。因此,本实验探讨复方黄柏液对 UC 模型大鼠血清中 IL-6,TNF-α 及 NF-κB,COX-2 的影响,以期为其作用机制研究提供理论基础。

材料与方法

1 药品与试剂

复方黄柏液(Z10950079)购于山东汉方制药有限公司;5% 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)购于北京伊诺凯科技有限公司,无水乙醇、完全弗氏佐剂购于美国 Sigma 公司;水合氯醛、TNF-α 和 L-6 Elisa 试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司;兔抗鼠 NF-κB 多克隆抗体、兔抗鼠 COX-2 多克隆抗体、Goat Anti-rabbit Ig G/HRP、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、预染宽范围蛋白质分子量标准条带、DAB 显色剂均购于北京博奥森生物技术有限公司。

2 实验动物

8 周龄 SPF 级 SD 大鼠,共 50 只,雌雄对半,体重 180 ~ 200 g;实验用雄性家兔 9 只,体重约 2 kg,均由河北北方学院动物中心提供,许可证号:SYXK(冀)2019-004。在实验过程中,分笼饲养,室温 18 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 60%,空气新鲜,自由摄食、饮水,通风良好,所有操作符合实验动物伦理学原则。

3 UC 模型的建立

3.1 家兔肠黏膜抗原的制备 选用实验用健康家兔 9 只,以空气栓塞法处死,剖腹取出结肠,无菌生理盐水冲洗干净,刮取结肠黏膜组织,加入等量生理盐水,用超声粉碎仪粉碎,制成肠黏膜组织匀浆液,4 ℃,3 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 30 min,取上清,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。

3.2 抗原预免疫与 TNBS 灌肠 家兔肠黏膜抗原液与等体积的完全弗氏佐剂混匀,制成抗原乳化液。选用 50 只 SD 大鼠,随机分为空白对照组(n = 15),造模组(n = 35)。造模组分别于预免疫 d 1,15,22 注射抗原乳化液于足跖、腹股沟等部位,每次注射含抗原蛋白 8 $mg \cdot 只^{-1}$。d 29 用 10% 的水合氯醛麻醉大鼠,TNBS(稀释成浓度 120 $mg \cdot mL^{-1}$)与 50% 乙醇 1∶1比例混合,TNBS 100 $mg \cdot kg^{-1}$ 体重进行灌肠。灌肠时用直径 2 mm、长约 10 cm 的硅胶管从肛门缓慢插入肠腔内 8 cm 左右,注入混合液(5 s 内),约 0.5 ~ 0.7 $mL \cdot 只^{-1}$,捏紧肛门平放 5 min,实验后常规饲养,于灌肠后 d 6 随机剖杀大鼠 5 只,光镜下结肠黏膜病理学检查,确认模型成功。空白对照组大鼠给予相应体积的蒸馏水,正常喂养,自由活动饮水。

4 模型鉴定标准

造模出现半稀便、肉眼血便、稀便、大便隐血阳性中的任一症状,则可视为造模成功。造模结束后 d 2 杀取模型组大鼠,经光镜观察解剖后的结肠组织,出现以下任 1 项:黏膜及黏膜下层炎性细胞浸润、腺体不规则、杯状细胞缺失、隐窝脓肿、黏膜糜烂、溃疡形成,可确定模型成功。

5 给药方法

各组从造模成功 d 2 给药,治疗药物剂量确定:小鼠和人之间给药剂量换算公式:人∶小鼠 = 0.11 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$∶1.0 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$。复方黄柏液:1 $mL \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$(人)换算为 9 $mL \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$(小鼠)。每天称重 1 次,依据大鼠末次体重调整给药剂量。给药时间为 2 周。大鼠末次给药 24 h 后,颈椎脱臼法处死大鼠,取距肛门 8 cm 结肠,沿纵轴剪开,刮取结肠黏膜组织,置于液氮中,-70 ℃保存。正常对照组和模型组给予等体积的生理盐水。

6 观察指标与方法

6.1 大鼠一般状态的观察 观察各组大鼠一般状态,如摄食、饮水情况、体重、毛色、活动度、大便形态及存活情况等方面变化。

6.2 结肠黏膜及组织损伤指数观察 取出大鼠结肠,肉眼观察肠黏膜外观,进行结肠组织评分:无损伤 0 分;黏膜充血但没有溃疡 1 分;充血而且肠壁变厚但没有溃疡 2 分;有 1 处溃疡但没有肠壁的增厚 3 分;有 2 处或 2 处以上的溃疡/炎症 4 分;有 2 处或 2 处以上的大溃疡或有 1 处溃疡/炎症沿结肠纵轴超过 1 cm 5 分;沿结肠纵轴的损伤超过 2 cm 以上每超过 1 cm 加 1 分。

取近肛门端 1.5 cm 结肠组织及有溃疡部位结肠组织,予 10% 甲醛固定每只大鼠的结肠组织做 4

块 HE 染色切片,平铺于解剖显微镜载物台上观察损伤情况,进行结肠组织病理评分。观察每张片子的结肠组织学改变,并按以下的标准进行评分。炎症严重程度:无 0 分、轻度 1 分、中度 2 分、重度 3 分;黏膜损伤程度:无 0 分、黏膜层 1 分、黏膜和黏膜下层 2 分、肌层 3 分;隐窝破坏:无 0 分、基底 1/3 的隐窝被破坏 1 分、基底 2/3 隐窝破坏 2 分、仅有完整的表面上皮 3 分、整个隐窝和上皮被破坏 4 分;涉及的病变范围:无 0 分、1% ~25% 为 1 分、26% ~50% 为 2 分、51% ~75% 为 3 分、>75% 为 4 分、总分为 14 分。组织病学评分为炎症严重程度分数、黏膜损伤程度分数、隐窝破坏程度分数和病变范围的总和。

6.3 IL-6 及 TNF-α 含量的测定 采集大鼠空腹动脉血 5 mL,分离血清,取上清液,置于 -20 ℃储存备用。IL-6 和 TNF-α 含量用 ELISA 法检测,严格按照说明书步骤操作。

6.4 NF-κB 及 COX-2 检测 大鼠处死后,取全结肠,放入 -80 ℃。提取组织中总蛋白:将剪刀剪碎组织块,加入 400 μL 裂解液于匀浆器中进行匀浆。然后置于冰上裂解 30 min 后,移入离心管中,4 ℃ 12 000 $r \cdot min^{-1}$离心 5 min,取上清液分装,放置 -20 ℃保存。取 40 μg 总蛋白与上样液混合,加入聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离。聚偏氟乙烯(PVDF)转膜并标记膜的方向。用脱脂奶粉封闭 1 h,室温振荡、漂洗液漂洗,加入兔多克隆一抗 NF-κB(1∶1 000),COX-2(1∶1 000),封口,4 ℃孵育过夜;洗膜后,加入漂洗液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例 1∶2 000)。ECL 试剂盒显色发光,以 β-actin 为内参照,校正后进行统计分析。

7 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。组间比较采用单因素方差分析,两两比较,方差齐时用最小显著差数法(LSD)法,方差不齐时用 Dunnett T3 法,$P<0.05$ 为有统计学显著差异。

结 果

1 大鼠的一般情况比较

模型复制过程中抽检大鼠 5 只,死亡 2 只;空白组中死亡 1 只。共计 42 只大鼠进入药物治疗阶段:空白组 14 只,模型组、复方黄柏液组各 14 只。正常对照组大鼠活泼好动、毛发光亮、浓密、大便成形、色味正常、皮肤弹性良好。模型对照组大鼠在造模后,逐渐表现出少动、皮毛散乱、行动迟缓、喜蜷缩、毛色发黄、皮肤松驰、弹性下降、大便质稀、不成形或小颗粒状、便中带血、臭味较重。复方黄柏液组,与模型组比,总体状态好,体形正常、活动度增加、反应较前灵敏、皮毛明显顺滑、光泽度提高、大便较前成形。治疗阶段复方黄柏液组与空白组均无大鼠死亡。模型组死亡 3 只,死亡率为 21.4%,其中 1 只为结肠穿孔死亡,1 只为胃肠道胀气致死亡,1 只为肺部感染死亡。

2 大鼠结肠黏膜大体及镜下观察

空白对照组大鼠结肠壁弹性好有光泽,黏膜淡红色,无黏液及出血点。模型组大鼠结肠多见扩张,结肠袋减少或者消失,黏膜弥漫性充血水肿,散在糜烂溃疡,覆有脓性分泌物及出血灶;镜下见黏膜及黏膜下层腺管排列紊乱,有破坏甚至消失,局部糜烂、溃疡形成,大量炎性细胞浸润。复方黄柏液组皱襞较规则,结肠黏膜暗红色或淡红色,少量黏液附着,偶见少量糜烂及出血点;镜下见炎性细胞浸润减少,损伤黏膜逐渐修复。

3 复方黄柏液对 UC 大鼠结肠黏膜及组织损伤指数和体质量的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠结肠黏膜及组织损伤指数增加,体质量明显下降,具有显著性差异(P 均 <0.01);与模型组比较,复方黄柏液组降低结肠黏膜及组织损伤指数减轻,具有显著性差异(P 均 <0.01),但体质量变化不显著。见表 1。

表 1 复方黄柏液降低 UC 大鼠结肠黏膜损伤指数 $\bar{x} \pm s$

组别	n	结肠黏膜损伤指数	组织损伤指数	体质量变化/g
空白对照组	14	0.789 ±0.754	0.58 ±0.76	45.36 ±2.15
模型组	11	26.39 ±5.41[a]	18.57 ±1.29[a]	-12.67 ±2.83[a]
复方黄柏液组	14	4.65 ±0.78[b]	0.93 ±0.48[b]	16.30 ±3.58[b]

体质量变化 =19 d 体重 -1 d 体重;与空白对照组比较,a:$P<0.01$;与模型组比较,b:$P<0.01$(下同)

4 复方黄柏液对 UC 模型大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 含量的影响

从表 2 可知,与空白组比较,模型组血清 IL-6 和 TNF-α 含量升高,具有显著差异(P 均 <0.01)。与模型组比较,复方黄柏液组血清 IL-6 和 TNF-α 含量显著下降(均为 $P<0.05$)。

表 2 复方黄柏液对 UC 模型大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 含量的影响 $\bar{x}\pm s$,pg·mL^{-1}

组别	IL-6	TNF-α
空白对照组	35.55 ± 3.28	14.56 ± 0.26
模型组	51.96 ± 5.02[b]	31.71 ± 2.02[b]
复方黄柏液组	45.12 ± 3.01[c]	23.84 ± 0.57[c]

与模型组比较,c:$P<0.05$

5 复方黄柏液降低 UC 模型大鼠结肠 NF-κB 及 COX-2 蛋白表达

从表 3 可知,与空白组比较,模型组 NF-κB 蛋白和 COX-2 蛋白表达升高,具有显著差异($P<0.01$)。与模型组比较,复方黄柏液组 NF-κB 蛋白和 COX-2 蛋白表达显著下降($P<0.05$)。

表 3 复方黄柏液对 UC 模型大鼠结肠黏膜 NF-κB 及 COX-2 蛋白含量的影响 $\bar{x}\pm s$

组别	NF-κB	COX-2
空白对照组	0.28 ± 0.04	0.47 ± 0.09
模型组	0.78 ± 0.05[a]	1.28 ± 0.09[a]
复方黄柏液组	0.57 ± 0.05[b]	0.83 ± 0.06[b]

讨 论

UC 是一种病因尚不十分明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病,目前临床治疗多采用 5-氨基水杨酸(5-ASA)制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂或生物制剂。长期维持治疗不良反应多或费用昂贵,患者依从性差。复方黄柏液的主要成分为连翘、黄柏、金银花、蒲公英、蜈蚣,有抗革兰阳性菌、消炎和促进伤口愈合的作用,还能增强单核巨噬细胞的吞噬功能,提高非特异性免疫力。其适应证为清热解毒、消肿祛腐,用于疮疡溃后、伤口感染、属阳性者。李辉标等[4]进行的一项 Meta 分析,纳入 9 个随机对照试验(RCT)研究,共 651 例患者,结果显示复方黄柏液治疗 UC 有良好的疗效[5],但其作用机制尚不清楚。

本文旨在建立大鼠溃疡性结肠炎模型,以研究复方黄柏液对溃疡性结肠炎的疗效并探讨其治疗机制。通过查阅文献[6],造模方法主要有免疫法、复合法、化学物质诱导法、基因修饰模型和自发性动物模型。其中免疫复合法造模是持续而稳定的、更符合人类 UC 发病机制的理想动物模型。目前公认 TNBS 剂量在 100 mg·kg^{-1}时模型最为稳定[7],乙醇浓度 50% 为最佳,故 TNBS 灌肠剂量为 100 mg·kg^{-1} + 50% 乙醇。免疫法蛋白抗原剂量通常为 8 mg·只$^{-1}$。

IL-6 和 TNF-α 主要由巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞产生,是调节免疫细胞的关键细胞因子,与炎症的严重程度相关[8-10],可以促使中性粒细胞趋向炎症区域,加重肠组织内炎症细胞的浸润程度,影响肠道上皮细胞的正常功能。另外 TNF-α 还可激活凝血酶,导致微血管血栓,影响结肠黏膜的微循环,进一步加重结肠黏膜的损伤。因此,TNF-α 的过度表达在肠黏膜病变中是至关重要的。

目前普遍认可细胞因子介导的异常免疫反应在 UC 的发生中起重要作用[11]。有研究表明,NF-κB 的激活是人类慢性炎症性肠炎(IBD)和动物结肠炎中炎症反应的激活和增殖的关键步骤[12]。NF-κB 的活化可促进大量的炎症介质如 TNF-α,IL-1β,IL-6 和 COX-2 等表达,而这些炎性介质又进一步活化 NF-κB,形成一个正反馈循环,使炎症反应不断放大,加重肠道炎症反应和黏膜的损伤[13]。COX-2 为花生四烯酸转化为前列腺素代谢过程中的关键酶,与炎症反应密切相关。有研究证实[14],COX-2 启动子上具有 2 个 NF-κB 结合位点,在炎症情况下,NF-κB 被激活并转移至细胞核内,与 *COX-2* 基因上的启动子结合从而可以引起 COX-2 蛋白表达增强,抑制 NF-κB 可以导致 COX-2 表达完全抑制。COX-2 表达的增强本是损伤愈合过程中的一种保护性反应,对黏膜修复具有积极意义,能增强肠黏膜细胞保护力、促进肠上皮细胞增生和肠血流量,促进上皮细胞的修复。然而,NF-κB 持续表达可能导致 COX-2 过度表达,UC 患者肠黏膜组织中 COX-2 mRNA 和蛋白表达增高,且 COX-2 在 UC 患者的活动期的表达显著高于非活动期或正常人[15-17],说明 COX-2 参与了 UC 的发病,且与 UC 的疾病活动性有关。

实验结果显示,与空白组对比,模型组小鼠结肠中 IL-6,TNF-α,NF-κB 和 COX-2 蛋白表达升高,而给予复方黄柏液灌肠后,IL-6,TNF-α,NF-κB 和 COX-2 的表达显著减少。本实验结果表明复方黄柏液可能

通过抑制 NF-κB/COX-2 信号通路的激活,进一步降低炎性介质 TNF-α 和 IL-6 的表达,对 UC 起到治疗作用,为临床提供理论依据。

[参 考 文 献]

[1] SANDBORN WJ, PEYRIN-BIROULET L, ZHANG J, *et al*. Efficacy and safety of etrasimod in a phase 2 randomized trial of patients with ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(3): 550 – 561.

[2] REN TH, LV MM, AN XM, *et al*. Activation of adenosine A3 receptor inhibits inflammatory cytokine production in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis by down-regulating the nuclear factor-kappa B signaling[J]. *J Dig Dis*, 2020, 21(1): 38 – 45.

[3] ZHU X, WANG G, WU S, *et al*. Protective effect of D-carvone against dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in balb/c mice and LPS induced RAW cells via the inhibition of COX-2 and TNF-alpha[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2020, 39(3): 235 – 245.

[4] 李辉标, 陈慕媛, 丘振文, 等. 复方黄柏液治疗溃疡性结肠炎的 Meta 分析[J]. 中医药导报, 2018,305(7):102 – 105.

[5] 李敬峰, 张鹏飞,姜红英, 复方黄柏液保留灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效[J]. 实用临床医学, 2013,14(4):1 – 12.

[6] 常孟然, 林燕, 李文静, 等. 免疫复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型的探讨[J]. 世界中医药, 2016, 11(10): 2086 – 2093.

[7] 徐阳,唐艳萍. 溃疡性结肠炎中西医动物模型研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2013, 19(4): 469 – 472.

[8] GUO WJ, LIU W, JIN B, *et al*. Asiatic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via suppressing mitochondria-mediated NLRP3 inflammasome activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 232 – 238.

[9] LIU B, LIN QL, YANG T, *et al*. Oat β-glucan ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice[J]. *Food Function*, 2015, 6(11): 3454 – 3463.

[10] 唐春花. 感染相关生物标志物在临床应用的进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019,19(55):44 – 45,47.

[11] WEHKAMP J, HARDER J, WEICHENTHAL M, *et al*. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. *Inflam Bowel Dis*, 2003, 9(4): 215 – 223.

[12] ZHANG ZL, FAN HJ, YANG MY, *et al*. Therapeutic effect of a hydroxynaphthoquinone fraction on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(41): 15310 – 15318.

[13] 郝筱倩, 董蕾. 细胞因子的表达和 NF-κB 的激活在溃疡性结肠炎中作用机制的探讨[J]. 世界核心医学期刊文摘(胃肠病学分册), 2005(6): 1 – 3.

[14] 刘莹, 崔涛, 朱祖安, 等. NF-κB、COX-2 在结肠癌及癌前病变中的表达及其临床意义[J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(1): 15 – 19.

[15] 杨玉龙, 方维丽, 王邦茂, 等. 溃疡性结肠炎组织中环氧合酶-2mRNA 和蛋白的表达[J]. 中国综合临床, 2006, 22(7): 603 – 604.

[16] 刘波, 许春梅. HIF-1α、COX-2 在溃疡性结肠炎中的表达及与疾病活动性的关系[J]. 临床消化病杂志, 2008, 20(3): 172 – 175.

[17] 白卉,张邦乐,李宇华,等. 选择性环氧合酶-2 抑制剂 PC407 对 TNBS 诱导的大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(12): 1287 – 1293.

编辑:王宇梅/接受日期:2021 – 04 – 15