

活血健脾补肾法对结肠炎小鼠结肠组织 TNF- α 及其 mRNA 表达的影响

张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵

张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵, 深圳市第二人民医院中西医结合研究所 广东省深圳市 518035

通讯作者: 张永锋, 518035, 广东省深圳市笋岗西路3002号, 深圳市第二人民医院. szzyf2002@163.com

电话: 0755-83617283 传真: 0755-83228956

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Effects of *Huoxue*, *Jianpi* and *Bushen* recipe on expression of TNF- α and its mRNA in mice with colitis

Yong-Feng Zhang, Ru-Shan Chen, Zheng-Zhi Wu, Ming Li, Man-Ying Chen

Yong-Feng Zhang, Ru-Shan Chen, Zheng-Zhi Wu, Ming Li, Man-Ying Chen, Clinical Institute of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yong-Feng Zhang, the Second People's Hospital of Shenzhen, 3002 Sungang West Road, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China. szzyf2002@163.com

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-06

Abstract

AIM: To observe the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and its mRNA in colitis mice, and to explore the effects of *Huoxue Jianpi Bushen* recipe on it.

METHODS: The mouse model of ulcerative colitis was induced by dextran sulfate sodium (DSS). The mice were randomly divided into six groups: normal control, model, sulfasalazine (SASP), *Huoxun*, *Jianpi*, and *Bushen* group. The expression of TNF- α and its mRNA in the mice were examined by immunohistochemistry and *in situ* hybridization.

RESULTS: The colonic histological scores (for inflammation, depth of the illness, damage of the recess) of the mice in the model group were 4.85 ± 2.1 , 5.77 ± 2.2 , and 7.76 ± 2.4 , respectively, which were significantly higher than those in *Huoxue* group (2.24 ± 2.4 , 2.53 ± 2.5 , 3.49 ± 2.3), *Jianpi* group (2.76 ± 2.2 , 2.89 ± 2.4 , 3.87 ± 2.3), and *Bushen* group (2.12 ± 2.3 , 2.33 ± 2.2 , 3.44 ± 2.4) (all $P < 0.05$). The expression of TNF- α (integral after staining, mean optical density, mean grey) in model group (6.8 ± 1.4 , 0.35 ± 0.03 , 78.6 ± 4.4) was significantly different from those in *Huoxue* group (3.7 ± 1.1 , 0.18 ± 0.05 , 137.9 ± 6.7), *Jianpi* group (3.4 ± 1.3 , 0.16 ± 0.03 ,

155.1 ± 8.8), and *Bushen* group (3.1 ± 1.5 , 0.17 ± 0.04 , 145.62 ± 7.6) (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: TNF- α plays an important role in the occurrence of ulcerative colitis induced by DSS, and the recipe of *Huoxue*, *Jianpi*, and *Bushen* can prevent and cure this disease by down-regulating the expression of TNF- α .

Key Words: Ulcerative colitis; Traditional Chinese Medicine; Tumor necrosis factor- α ; Dextran sulfate sodium

Zhang YF, Chen RS, Wu ZZ, Li M, Chen MY. Effects of *Huoxue*, *Jianpi* and *Bushen* recipe on expression of TNF- α and its mRNA in mice with colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(19):2375-2378

摘要

目的: 观察TNF- α 及其mRNA在结肠炎小鼠结肠组织的表达, 探讨活血健脾补肾法方药对其影响。

方法: 用右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠产生溃疡性结肠炎模型。将小鼠随机分为空白对照、模型、柳氮磺胺吡啶(SASP)、活血法、健脾法及补肾法组; 免疫组化、原位杂交法分别观察治疗后小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA的表达。

结果: 模型组小鼠结肠组织学损伤积分(炎症、病度深度、隐窝破坏)分别为 4.85 ± 2.1 , 5.77 ± 2.2 , 7.76 ± 2.4 ; 活血法组(2.24 ± 2.4 , 2.53 ± 2.5 , 3.49 ± 2.3)、健脾法组(2.76 ± 2.2 , 2.89 ± 2.4 , 3.87 ± 2.3)、补肾法组(2.12 ± 2.3 , 2.33 ± 2.2 , 3.44 ± 2.4)与模型组比较有显著意义(4.85 ± 2.1 , 5.77 ± 2.2 , 7.76 ± 2.4) (均 $P < 0.05$)。模型组小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA的表达(染色积分、平均光密度、平均灰度)分别是 6.8 ± 1.4 , 0.35 ± 0.03 , 78.6 ± 4.4 ; 活血法组(3.7 ± 1.1 , 0.18 ± 0.05 , 137.9 ± 6.7)、健脾法组(3.4 ± 1.3 , 0.16 ± 0.03 , 155.1 ± 8.8)、补肾法组(3.1 ± 1.5 , 0.17 ± 0.04 , 145.62 ± 7.6)与模型组比较有显著意义(6.8 ± 1.4 , 0.35 ± 0.03 , 78.6 ± 4.4) (均 $P < 0.05$)。

结论: TNF- α 参与DSS诱导小鼠溃疡性结肠炎的形成, 活血、健脾及补肾法方药通过下调TNF- α 的表达发挥防治作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; 中医药疗法; 肿瘤坏死因子; 葡聚糖硫酸钠

张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵. 活血健脾补肾法对结肠炎小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志

2005;13(19):2375-2378

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2375.asp>

0 引言

中医药治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的优势在于降低复发率及较好的远期疗效,根据中医理论,综观慢性UC(缓解期)临床治疗的有关方药,其治法基本属于活血、健脾、补肾范畴^[1].因此,我们以经典方桃红四物汤、参苓白术散、金匱肾气丸作为上述治法的代表方药,模拟具有慢性期的UC动物模型,探讨上述三种治法对结肠炎小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA表达的影响,阐明中医药防治UC的分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♀ BALB/C小鼠90只,体质量 20 ± 2 g,购自广州中医药大学实验动物中心.实验药物:金匱肾气丸按《金匱要略》:干地黄24 g、山药12 g、山茱萸12 g、泽泻9 g、茯苓9 g、牡丹皮9 g、桂枝3 g、附子3 g.参苓白术散按《太平惠民和剂局方》:莲子肉10 g、薏苡仁10 g、缩砂仁10 g、桔梗10 g、白扁豆15 g、白茯苓20 g、生晒参20 g、甘草20 g、白术20 g、山药20 g.桃红四物汤按《医宗金鉴》:干地黄15 g、川芎8 g、白芍10 g、当归12 g、桃仁6 g、红花4 g.阳性对照药柳氮磺胺吡啶(SASP),上海三维制药有限公司提供.药物制备:每种方药置于搪瓷药罐中,加适量蒸馏水浸泡2 h,加热煮沸30 min,滤出头煎,药渣加蒸馏水适量,再煮沸30 min,滤出二煎,合并二次滤液.金匱肾气丸加热浓缩至浓度为405 g/L,参苓白术散浓度为775 g/L,桃红四物汤浓度为295 g/L,原液装瓶,高压消毒后密封保存.SASP碾磨成粉,配成浓度为20 g/L的混悬液.实验试剂与仪器:DSS(M_r 5 000),Fluka公司产品,配成30 g/L浓度,TNF- α 免疫组化及原位杂交试剂盒,DAB显色试剂盒,苏木素均购自武汉博士得生物工程有限公司.40 g/L多聚甲醛、原位杂交专用盖玻片(博士得公司产品),杂交盒,S-HH-W型恒温水箱(上海浦东跃欣科学仪器厂),SYQ-ZDX-35B I型自动座式压力蒸气灭菌器(上海申安医疗器械厂),CMIAS真彩色病理图像分析系统(北京航空航天大学),Nikon P-III显微摄影系统(日本),SPX-150型电热恒温培养箱(上海跃进医疗仪器厂),BIORAD MODEL 550酶标仪(美国)等.

1.2 方法 参考文献[2,3],将小鼠随机分为6组,分别为空白对照、模型、SASP、活血法、健脾法及补肾法组,每组15只.除空白对照组外,其余各组小鼠自由饮用30 g/L DSS液7 d,第8 d起自由饮用蒸馏水14 d,第22 d起药物组(SASP、活血法、健脾法及补肾法组)分别给药,小鼠给药量SASP 0.8 g(kg·d),桃红四物汤11.8 g(kg·d),参苓白术散31 g(kg·d),金匱肾气丸16.2 g(kg·d),均灌胃给药,1

次/d,共7 d,观察小鼠一般情况及称质量,进行疾病活动指数(DAI)评分.第29 d处死小鼠取结肠(2 mm \times 10 mm),40 g/L多聚甲醛(含DEPC)固定、石蜡包埋、切片HE染色评估组织学损伤,用免疫组织化学、原位分子杂交方法观察TNF- α 及其mRNA的表达,均按试剂盒说明书进行操作.

1.2.1 DAI的评估^[4] 每日观察小鼠的体质量、大便性状和隐血情况.将体质量下降、大便性状和隐血情况的评分相加,得出每只小鼠的DAI,以评估疾病活动情况.

1.2.2 组织学损伤的评估^[5] 用颈椎脱臼法处死小鼠,剖腹,取肛门至回盲部的结肠,沿肠系膜边缘纵行剖开,在解剖镜下观察结肠大体形态.每只小鼠于有严重炎症或溃疡处取组织标本(2 mm \times 10 mm),常规石蜡包埋、切片(4 μ m),HE染色,观察组织学改变.组织学损伤程度用炎症、病变深度、隐窝破坏评分与病变范围评分的乘积表示.

统计学处理 所有数据经SPSS 10.0统计软件处理,各组资料用mean \pm SD表示,采用非参数统计方法Wilcoxon秩和检验比较各组资料间的差异, $P<0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 判定标准

2.1.1 采用半定量积分法^[6] 计算免疫组织化学染色积分,即分别对每张切片的阳性细胞及阳性细胞着色程度进行分级记分,结果以两项之和表示.阳性细胞率:每张切片检测5个视野($\times 400$),所见的阳性细胞分为0-4级(共5级):0级为阴性,记0分;1级阳性细胞占1-25%,记1分;2级阳性细胞占26-50%,记2分;3级阳性细胞占51-75%,记3分;4级阳性细胞占76-100%,记4分.染色强度:显微镜下观察,仅细胞核着蓝色者为阴性,细胞浆或核膜上呈棕黄色为阳性;强度分0-3级(共4级):0级为阴性,记0分;1级为弱阳性染色,记1分;2级为阳性染色,记2分;3级为强阳性染色,记3分.

2.1.2 原位杂交判定方法 以细胞胞质着色呈棕黄色为阳性.计算机图像分析采用北京航空航天大学图像分析中心和空军总医院生物医学工程研究所研制的CMIAS真彩色病理图像分析系统进行,在光镜下($\times 400$)每张切片随机选取5个视野,用“体视学分析”模型作图像分析后,计算平均光密度和平均灰度.

2.2 活血健脾补肾法方药对小鼠结肠慢性炎症疗效比较 停止饮用30 g/L DSS溶液14 d后,全部小鼠腹泻、血便症状均消失,大便隐血试验均阴性,体质量恢复至饮用DSS之前的水平或略有增加,体毛有光泽,活动正常,DAI值为0.组织学损伤评分的比较见表1.

2.3 各组小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA的表达 染色积分、平均光密度及平均灰度值的比较见表2.

表1 各组小鼠组织学损伤评分的比较 (mean ± SD)

组别	n	积分		
		炎症	病变深度	隐窝破坏
正常组	15	0	0	0
模型组	15	4.85 ± 2.1 ^a	5.77 ± 2.2 ^a	7.76 ± 2.4 ^a
SASP组	15	4.31 ± 2.3	5.14 ± 2.1	7.11 ± 2.2
活血组	15	2.24 ± 2.4 ^c	2.53 ± 2.5 ^c	3.49 ± 2.3 ^c
健脾组	15	2.76 ± 2.2 ^c	2.89 ± 2.4 ^c	3.87 ± 2.3 ^c
补肾组	15	2.12 ± 2.3 ^c	2.33 ± 2.2 ^c	3.44 ± 2.4 ^c

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

表2 三种治法对小鼠结肠组织TNF-α及其mRNA表达的影响 (mean ± SD)

组别	n	染色积分值	平均光密度	平均灰度
正常组	15	1.4 ± 0.3	0.15 ± 0.05	121.8 ± 5.7
模型组	15	6.8 ± 1.4 ^a	0.35 ± 0.03 ^a	78.6 ± 4.4 ^a
SASP组	15	5.8 ± 1.2	0.34 ± 0.06	97.4 ± 4.8
活血组	15	3.7 ± 1.1 ^c	0.18 ± 0.05 ^c	137.9 ± 6.7 ^c
健脾组	15	3.4 ± 1.3 ^c	0.16 ± 0.03 ^c	155.1 ± 8.8 ^c
补肾组	15	3.1 ± 1.5 ^c	0.17 ± 0.04 ^c	145.6 ± 7.6 ^c

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

3 讨论

现已证实细胞因子在UC局部炎症反应和免疫反应中起重要作用^[7]. 白介素-1(IL-1), IL-6, IL-8和TNF-α等促炎症细胞因子是公认的能介导UC发病的细胞因子, 而一些具有抗炎作用的细胞因子, 如IL-4、IL-10等, 在维持肠道正常的免疫功能中起重要作用, 如果抗炎与促炎因子的平衡状态被破坏, 如促炎因子一方占优势, 则导致疾病的发生, 其中TNF-α在多种细胞因子网络中居重要地位^[8]. TNF-α主要由活化的单核细胞和巨噬细胞所产生, 在炎症性肠病(IBD)主要以旁分泌和自分泌的方式在肠黏膜局部发挥作用, 肠道菌群产生的脂多糖可直接活化黏膜固有层中的巨噬细胞, 促其增生, 进而释放TNF-α. TNF-α可促使其它细胞因子的释放, 细胞因子之间形成网络, 扩大炎症连锁反应造成肠黏膜损伤; TNF-α还可以活化内皮细胞, 改变其细胞表面整合素的表达, 增加Ca²⁺的浓度, 促进白细胞、血小板黏附到内皮细胞上; TNF-α提高血管通透性, 减少血栓调节素的释放, 激活组织因子促进血栓形成同时抑制纤溶酶原激活抑制剂-1的合成而导致机体处于促凝血状态, 形成微血栓造成肠组织微循环障碍^[9-11].

本实验结果表明: (1)模型组小鼠结肠组织学损伤积分(炎症、病度深度、隐窝破坏)明显高于空白对照组, 而活血法、健脾法及补肾法组结肠组织学损伤积分则低于模型组, 表明DSS诱导小鼠形成了结肠炎模型, 活血法、健脾法及补肾法方药有一定的防治作用. (2)模型组结肠组织TNF-α及其mRNA的表达高于正常对照组, 活血、健脾及补肾组结肠组织TNF-α及其mRNA的表达低于模型

组; 提示TNF-α参与DSS诱导UC小鼠的形成, 活血、健脾及补肾法方药通过下调TNF-α及其mRNA的表达发挥防治作用.

现代医学认为, UC发病主要与免疫以及遗传相关, 而遗传素质和免疫失调与中医脾胃关系密切. 肾藏精, 主生殖, 先天禀赋差异主要归于"肾", 而"肾"特别是"肾阳"与神经内分泌密切相关; 脾为元气生成之所, 主卫, 机体免疫功能与"脾"的功能状态相关. 因此通过长期健脾补肾, 可以影响神经内分泌网络, 调节激素、神经递质、细胞因子的变化与基因表达, 从而影响活性物质的释放, 改善机体免疫失衡状态. "正气存内, 邪不可干", 机体免疫功能是人体抵抗病邪的能力, 亦是机体内环境稳定的重要因素^[12-14]. 现代中医认为^[15]UC之所以难治, 在病机上除了气滞、湿阻外, 往往还由于有"瘀"的存在. 现代研究表明, UC的炎症程度与血液的高黏度相关, 炎症越重, 外在腹泻越重, 内在血液黏度愈高; 而且UC病变处局部明显存在血液循环障碍, 黏膜缺血缺氧改变, 用活血祛瘀药能起到调整免疫, 清除炎症产物与细胞毒, 改善血液高凝状态, 抑制黏膜异常增生与组织纤维化等作用, 有利于消除症状.

4 参考文献

- 1 粟广辉, 张红, 田德录. 慢性溃疡性结肠炎证治探讨. 中国中西医结合消化杂志 2001; 9: 112-113
- 2 胡仁伟, 欧阳钦, 陈代云. 右旋葡聚糖硫酸钠小鼠溃疡性结肠炎动物模型建立方法探讨. 胃肠病学 2002; 7: 331-334
- 3 王群英, 陈村龙, 王继德, 赖卓胜, 刘荣, 张亚历. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎小鼠模型的建立. 第一军医大学学报 2002; 22: 608-610
- 4 Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- 5 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- 6 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- 7 王婷, 郑长青. 细胞因子在炎症性肠病发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 72-75
- 8 庞艳华, 郑长青. Th1/Th2细胞亚群与炎症性肠病的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1922-1924
- 9 周婷, 林平, 潘慧, 梅林. 溃疡性结肠炎发病机制及其研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1782-1786
- 10 郭海建, 邓长生, 夏冰. 溃疡性结肠炎患者肿瘤坏死因子α与T细胞亚群的变化及其相关性研究. 中国病理生理杂志 2001; 7: 1252-1255
- 11 邱明义, 范恒, 梅家俊, 沈关心, 刘松林, 赵映前. 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织TNF-α mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 706-710
- 12 沈自尹. 有关证与神经内分泌免疫网络的研究. 中医药学刊 2003; 21: 10-14

- 13 刘晓玲, 王汝俊, 周福生. 溃疡性结肠炎的免疫学机制以及中医与之的关系. 现代中西医结合杂志 2003; 12: 440-442
- 14 刘慧荣, 郑昱, 吴焕淦, 费晓燕. 溃疡性结肠炎相关基因研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1631-1637
- 15 章阳, 叶晨玉. 浅谈非特异性溃疡性结肠炎从痰论治. 甘肃中医 2005; 18: 4-5

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 BREIF REPORT •

蜜调通关散及其拆方对家兔肠道作用机制

梁劲军, 黄阳勇, 庆方

梁劲军, 黄阳勇, 广州市中医医院肛肠科 广东省广州市 510130
庆方, 广州市中医药研究所 广东省广州市 510000
广东省中医药管理局资助课题 No. 101041
通讯作者: 梁劲军, 510130, 广东省广州市珠玑路16号, 广州市中医医院肛肠科. jijj3721@sina.com
电话: 020-81886504-1005
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

Effects of *Mitiao Tongguansan* decoction and its different ingredients on function of intestinal tract in rabbits

Jin-Jun Liang, Yang-Yong Huang, Fang Qing

Jin-Jun Liang, Yang-Yong Huang, Department of Anus and Intestine, Traditional Chinese Medical Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China
Fang Qin, Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China
Supported by the Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Province, No.101041
Correspondence to: Jin-Jun Liang, Department of Anus and Intestine, Traditional Chinese Medical Hospital of Guangzhou, 16 Zhuji Road, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China
Received: 2005-04-15 Accepted: 2005-05-14

Abstract

AIM: To investigate the effects of *Mitiao Tongguansan*

(MT) decoction and its different ingredients on the function of intestinal tract in rabbits.

METHODS: The jejunum and ileum of the rabbits were ligated into six segments, into which MT decoction, normal saline (NS), asarum oil (AO), extraction from abnormal Chinese honeylocust (ECH), *Shuitiao Tongguansan* (ST) decoction, and honey were randomly injected. Then the degree of inflammation, intestinal squirm, mucous congestion, and the liquid volume in every ligated intestinal segment were observed. The motility curves of the isolated intestinal segment under the action of each drug were drawn and analyzed.

RESULTS: The intestinal segment in MT decoction group contained the most amount of liquid volume, which was significantly different from that in the honey group (4.86 ± 1.64 mL vs 3.96 ± 1.23 mL, $t = 3.10$, $P = 0.003$). The liquid volume decreased in ECH (3.79 ± 1.41 mL), ST decoction (3.11 ± 0.89 mL), AO (1.67 ± 0.83 mL), and NS group (1.03 ± 0.32 mL) ($P < 0.01$). The contractions of the smooth muscle were basically the same in ECH, ST decoction, and MT decoction group ($\chi^2 = 0.04$, $P = 0.98$), but they were stronger than those in the other three groups. The degrees of