

# 不同给药途径对大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜EGF表达的影响

王雪茜, 王新月, 杨莉莉

## ■背景资料

溃疡性结肠炎被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一, 是中医消化胃肠领域所关注的热点。目前中医药对本病的研究主要集中在经方验方的疗效方面, 少数研究应用现代方法技术探讨了单独药物或方剂的治疗机制, 鲜有报道把关注热点集中在给药途径的比较上。

王雪茜, 王新月, 杨莉莉, 北京中医药大学东直门医院 北京市 100700

国家自然科学基金资助项目, No. 30572390

国家中医药管理局中医药科学技术研究基金资助项目, 国中医药科02-03GP03

通讯作者: 王新月, 100700, 北京市东城区海运仓5号, 北京中医药大学东直门医院, wxy6687@sina.com

电话: 010-84013361

收稿日期: 2006-05-19 接受日期: 2006-06-30

## Effects of different administration approaches on expression of epidermal growth factor after in rats with ulcerative colitis

Xue-Qian Wang, Xin-Yue Wang, Li-Li Yang

Xue-Qian Wang, Xin-Yue Wang, Li-Li Yang, Dongzhimen Hospital affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572390, and State Administration of Chinese Medicine Science and Technology Foundation of China, National Chinese Medicine Department 02-03GP03

Correspondence to: Dr. Xin-Yue Wang, Dongzhimen Hospital affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 5 Haiyuncang, Dongcheng District, Beijing 100700, China. wxy6687@sina.com

Received: 2006-05-19 Accepted: 2006-06-30

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of *Kui Jieyin* given in different ways on the expression of mucosal epidermal growth factor (EGF) in the rectum and colon of rats with ulcerative colitis (UC), and explore a better method for the treatment of UC.

**METHODS:** The UC rat model was induced by intermixture of TNBS and ethanol. All the rats were divided into 5 groups. Normal group ( $n = 15$ ) and model group ( $n = 15$ ) were given distilled water. The rest rats were intragastrically administered with olsalazine sodium (group A) or *Kui Jieyin* (group B), or treated with *Kui Jieyin* enema (group C). Then the expression of rectal and colonic mucosal EGF was detected by im-

munohistochemical staining.

**RESULTS:** After drugs interference, the expression of colonic mucosal EGF in UC was increased, especially in group B and C. For the active UC, the expression of EGF was higher in group B than that in group C (no significance) or A ( $0.312 \pm 0.160$  vs  $0.217 \pm 0.052$ ,  $P < 0.05$ ). The drugs had no marked effect on the UC in the middle stage. For the late-stage UC, expression of EGF was significantly increased in group B and C. Furthermore, there was notable difference between group C and B ( $0.372 \pm 0.132$  vs  $0.307 \pm 0.101$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Intragastric administration of *Kui Jieyin* is superior in the acute stage of UC, while *Kui Jieyin* clyster has constant effect from the beginning to the end of this disease. Combination of these two approaches may accelerate the conrescence of ulcer.

**Key Words:** *Kui Jieyin*; Epidermal growth factor; Ulcerative colitis; Rats

Wang XQ, Wang XY, Yang LL. Effects of different administration approaches on expression of epidermal growth factor after in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(29):2872-2875

## 摘要

**目的:** 观察中药溃结饮不同给药途径对大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜EGF表达水平的影响, 揭示口服与灌肠给药结肠黏膜修复的作用特点, 获得指导合理选择用药途径, 制定综合治疗方案的理论和实验依据。

**方法:** 采用TNBS/乙醇法造模, 将大鼠随机分为5组, 正常组和模型组蒸馏水灌胃, 其余分别为奥沙拉秦钠灌胃组, 溃结饮灌胃组和灌肠组。采用免疫组化方法及图像分析测定不同给药途径下, 结肠黏膜表皮生长因子(EGF)表达的动态变化。

**结果:** 药物干预后大鼠溃疡性结肠炎结肠黏

膜EGF表达含量增加, 溃结饮治疗组别优势明显. 急性期溃结饮灌胃后EGF表达量超过溃结饮灌肠组和奥沙拉秦钠组, 与灌肠组比较无统计学意义, 与奥沙拉秦钠组比较差异有显著性 ( $0.312 \pm 0.160$  vs  $0.217 \pm 0.052$ ,  $P < 0.05$ ). 病程中期药物干预作用不明显. 后期中药溃结饮无论在灌胃还是在灌肠方面都显示出其增加黏膜EGF含量的优势, 且溃结饮灌肠组优于溃结饮灌胃组, 两者比较差异有显著性 ( $0.372 \pm 0.132$  vs  $0.307 \pm 0.101$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 溃结饮灌胃起效快, 急性期占一定优势; 溃结饮灌肠起效较慢, 从开始发挥作用直至病程末期都能良好促进黏膜修复. 联合应用两种给药方法, 急性期和中后期分别以口服和灌肠为主治疗本病, 可能会有效缩短黏膜修复时间, 加快溃疡愈合.

**关键词:** 溃结饮; 表皮生长因子; 溃疡性结肠炎; 大鼠

王雪茜, 王新月, 杨莉莉. 不同给药途径对大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜EGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2872-2875

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2872.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)以腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重为主要临床表现, 被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一, 是当前中医消化胃肠领域所关注的热点. 临床治疗UC的途径与方法多样, 主要以口服、灌肠及口服灌肠相结合为主. 究竟口服和灌肠治疗哪一种方式更有利于溃疡的愈合和疾病的康复尚无深入研究. 溃结饮为田德禄老师临床治疗UC的经验方之一<sup>[1]</sup>, 主要组成有黄柏、苦参、炮姜、肉桂粉、三七粉等, 疗效确切. 本实验通过比较中药溃结饮不同给药途径及西药奥沙拉秦钠对UC大鼠结肠黏膜EGF表达水平的影响, 揭示在口服与灌肠给药在黏膜修复方面的作用特点. 获得合理选择UC用药途径和制定综合治疗方案的指导理论和实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级健康♂SD大鼠, 体质量180-220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号SCXK京2002-0003; 奥沙拉秦钠胶囊由天津力生制药股份有限公司生产, 配置成水溶液(24 g/L). 溃结饮由黄柏、苦参、炮姜、肉桂粉、三七粉等组成, 生药量1264 g/L

用于灌胃, 生药量2528 g/L用于灌肠. 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)由Sigma公司生产. 乌拉坦(氨基甲酸乙酯), 购于恒业中远化工有限公司. EGF兔抗鼠一抗和即用型SABC试剂盒, 购于武汉博士德生物工程有限公司; Shandon全自动石蜡切片机, Shandon半自动石蜡包埋机, Nikon显微照相系统, Image-Pro Plus 4.1图像分析系统.

**1.2 方法** 将清洁级健康SD大鼠135只禁食36 h, 然后随机抽取120只用200 g/L乌拉坦(5 mL/kg)麻醉后, 用50 g/L TNBS与500 mL/L乙醇12:5比例混合的复合物于结肠肛门以上8-10 cm处注射(其中TNBS 120 mg/kg), 见黏液脓血便则造模成功; 造模后的动物随机分为模型组、奥沙拉秦钠组、溃结饮灌胃组和溃结饮灌肠组, 每组30只, 进行药物干预(各组给药量为体质量50 kg成年人用量的8倍). 另设正常组15只作为对照. 正常组和模型组每天以蒸馏水灌胃一次(10 mL/kg); 奥沙拉秦钠对照组每天以奥沙拉秦钠混悬液灌胃一次(0.24 g/kg); 溃结饮灌胃组每天以溃结饮灌胃一次(12.64 g/kg); 溃结饮灌肠组每天以溃结饮灌肠一次(12.64 g/kg), 疗程共4 wk; 实验动物每次取材前禁食不禁水24 h, 模型组、奥沙拉秦钠组、溃结饮灌胃组、溃结饮灌肠组分别于造模后1, 2, 4 wk各组随机抽取10只大鼠, 正常组于同一时间随机抽取5只, 以200 g/L乌拉坦(4 mL/kg)腹腔麻醉后, 剖腹取结肠上距肛门8-10 cm处组织1-2 cm, 用生理盐水冲洗干净后, 置于40 g/L甲醛中固定, 之后制作6 μm厚切片, 进行标准免疫组化染色操作. Nikon显微照相系统观察病理改变、阳性颗粒着色情况, 继而用Image-Pro Plus 4.1图像分析系统统计比较结肠黏膜EGF阳性染色颗粒的吸光度(A).

## 2 结果

**2.1 不同给药途径对大鼠UC模型结肠组织中EGF阳性染色颗粒吸光度值(A)的影响** 第1周除模型组外3个药物干预组结肠黏膜EGF阳性染色颗粒吸光度值均显著增加, 奥沙拉秦钠组增加量低于溃结饮灌胃组和溃结饮灌肠组, 且溃结饮灌胃组与奥沙拉秦钠组比较( $0.312 \pm 0.160$  vs  $0.217 \pm 0.052$ ,  $P < 0.05$ ), 差异有显著性. 中药不同给药途径下无显著差异. 第2周模型组EGF阳性染色颗粒吸光度值(A)有所升高, 表明随病情发展大鼠自体修复机制启动. 这一时期各药物干预组别EGF阳性染色颗粒吸光度值均小于模型组, 其中溃结饮灌胃组EGF含量升高小于奥沙

## ■应用要点

由于临床治疗UC以口服、灌肠及口服灌肠相结合的用药方式为主. 所以从不同给药途径差异的角度探讨口服和灌肠治疗哪一种方式更有利于溃疡的愈合和疾病的康复有十分重要的理论和临床意义. 本实验通过比较中药溃结饮不同给药途径及西药奥沙拉秦钠对UC大鼠结肠黏膜EGF表达水平的影响, 揭示在口服与灌肠给药在黏膜修复方面的作用特点. 希望获得合理选择UC用药途径和制定综合治疗方案的指导理论和实验依据.

表 1 不同给药途径对UC大鼠模型结肠组织中EGF阳性染色颗粒吸光度值(A)的影响(mean ± SD)

分组	n	第1周	第2周	第4周
正常	5	0.106 ± 0.018	0.101 ± 0.013	0.101 ± 0.011
模型	10	0.181 ± 0.043	0.270 ± 0.099 <sup>b</sup>	0.212 ± 0.103 <sup>b</sup>
奥沙拉秦钠	10	0.217 ± 0.052 <sup>a</sup>	0.219 ± 0.092 <sup>bc</sup>	0.196 ± 0.075 <sup>a</sup>
溃结饮灌肠	10	0.265 ± 0.090 <sup>bc</sup>	0.254 ± 0.090 <sup>be</sup>	0.372 ± 0.132 <sup>acde</sup>
溃结饮灌胃	10	0.312 ± 0.160 <sup>bc</sup>	0.184 ± 0.041 <sup>ac</sup>	0.307 ± 0.101 <sup>acd</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.001 vs 正常组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 模型组; <sup>d</sup>P<0.001 vs 奥沙拉秦钠组; <sup>e</sup>P<0.05 vs 溃结饮灌胃组.

拉秦钠组, 差异有显著性. 溃结饮灌肠组EGF阳性染色颗粒吸光度值降低不明显, 溃结饮灌胃组较灌肠组降低明显(0.184 ± 0.041 vs 0.254 ± 0.090, P<0.05). 第4周无论溃结饮灌胃还是灌肠都明显促进了结肠黏膜EGF的表达使EGF阳性染色颗粒吸光度值(A)有所增高, 中药干预组与模型组和奥沙拉秦钠组比较都有显著差异, P值分别小于0.05和0.001. 溃结饮灌肠组EGF阳性染色颗粒吸光度值高于溃结饮灌胃组, 两者比较(0.372 ± 0.132 vs 0.307 ± 0.101, P≤0.05), 差异有显著性(表1).

2.2 EGF在大鼠UC结肠黏膜的表达部位 急性期正常组黏膜下层及血管内皮可见散在EGF弱阳性表达, 黏膜上皮、腺体和基层未见阳性棕黄色颗粒. 模型组肉芽组织表层、浅层和深层均可见稀疏的强阳性EGF表达颗粒, 肉芽组织间隙和溃疡周边结肠黏膜可见强阳性较密集的棕黄色. 奥沙拉秦钠组溃疡肉芽组织表层和浅层可见比较密集的强阳性EGF表达颗粒, 肉芽组织深层和血管内皮有少量阳性EGF颗粒. 溃结饮灌胃组肉芽和瘢痕组织深部EGF大量密集的表达. 少量毛细血管内皮细胞上也有EGF颗粒的弱阳性表达. 溃结饮灌肠组肉芽组织浅层和深层可见EGF颗粒的强阳性表达. 中期正常组和模型组EGF表达部位与急性期相同. 奥沙拉秦钠组溃疡肉芽组织表层至深层可见较多的强阳性EGF表达颗粒. 溃结饮灌胃组结肠黏膜表面和肉芽组织深层可见稀疏的强阳性棕黄色EGF表达颗粒, 血管内皮细胞上也可见少量阳性EGF颗粒. 溃结饮灌肠组黏膜下层、肉芽组织深层和血管内皮细胞上可见较密集的EGF颗粒的强阳性表达. 后期正常组结肠黏膜表面可见散在的EGF弱阳性表达颗粒. 模型组黏膜表面及下层可见稀疏的强阳性EGF颗粒表达, 以白细胞胞质中表达为多. 奥沙拉秦钠组黏膜表层可见少量棕黄色EGF阳性颗粒表达. 溃结饮灌胃组EGF集中在肉芽组

织间隙及深层. 溃结饮灌肠组黏膜下层、肉芽组织深层及重建中的黏膜组织中强阳性深染的EGF颗粒大量、集中的表达在成纤维细胞、纤维母细胞和白细胞胞质中. 血管内皮细胞上也可见少量阳性表达. 高倍镜下可见EGF颗粒主要表达在白细胞、纤维母细胞和部分成纤维细胞胞质中呈棕黄色深染的EGF阳性颗粒.

### 3 讨论

EGF由53个氨基酸残基组成, 相对分子质量为6 × 10<sup>3</sup> kDa, 其与受体EGFR结合后对创伤愈合、细胞的增殖分化及肿瘤的发生起到重要作用. EGF可以促进上皮细胞、间质细胞的生长, 增加黏膜细胞DNA, RNA和蛋白质合成, 增加黏膜血流, 促进黏液分泌, 刺激组织生长修复, 保护胃肠黏膜, 因此许多学者将其应用到UC的研究领域上. 研究发现, EGF腔内应用可诱导小肠黏液分泌杯状细胞分泌黏液, 保护鼠肠黏膜免受油酸诱导的损伤<sup>[2]</sup>, 从而维持了结肠黏膜的健康完整. Mazumdar *et al*<sup>[3]</sup>对小鼠UC模型采用EGF体内注射方法治疗, 结果发现, 结肠溃疡与炎症明显减轻. 此外, Sinha *et al*<sup>[4]</sup>通过实验证实, EGF灌肠能够有效治疗活动性左侧UC. 所以, EGF的黏膜保护和组织修复作用是有依据的, 他能促进黏膜细胞增殖和再生, 减轻炎症损伤, 加快溃疡愈合. 本研究中我们通过观察EGF阳性染色颗粒吸光度值来了解EGF的表达情况, 结果发现不同药物不同给药途径下结肠黏膜EGF的表达有一定差异. 首先, 中药溃结饮促进结肠黏膜修复的能力优于西药奥沙拉秦钠. 实验第1周造模各组结肠黏膜的EGF表达含量均有所增加, 其中, 模型组EGF的增多, 与正常组比较并无统计学意义, 可能由大鼠自身修复能力所诱导, 相比之下3个给药组结肠黏膜EGF表达增加明显; 且溃结饮灌胃组EGF表达高于奥沙拉秦钠组. 说明中药组促进黏膜细胞增殖再生, 加快溃疡愈合速

度的能力优于西药奥沙拉秦钠. 第2周给药各组EGF升高幅度有所下降, 模型组EGF表达量却显著增加. 这是因为第1周中相对较好的修复作用使3个给药组别的炎症已得到一定程度的控制. 而模型组此期其相对病变较重激发产生EGF过量表达而造成的. 第4周中药溃结饮治疗各组结肠黏膜EGF表达含量有所回升, 奥沙拉秦钠组该指标与中期相比变化不大. 溃结饮灌胃和灌肠组EGF表达含量都显著高于奥沙拉秦钠组和模型组. 这说明, 炎症后期中药溃结饮各组对破损结肠黏膜的修复能力仍优于奥沙拉秦钠组. 由上述结果可以推测, 中药溃结饮在病程急性期和后期均能显著增加损伤结肠黏膜EGF的表达, 从而行使EGF促进上皮细胞、间质细胞生长, 增加黏膜细胞DNA, RNA和蛋白质合成, 增加黏膜血流, 促进黏液分泌, 刺激组织生长修复的功能, 在这一点上优于西药奥沙拉秦钠. 其次, 中药不同给药途径对结肠黏膜EGF表达含量影响不同. 急性期溃结饮灌胃组与溃结饮灌肠组结肠黏膜EGF在表达含量上没有明显差异, 其中溃结饮灌胃增加EGF表达的能力显著优于奥沙拉秦钠, 溃结饮灌肠组却与奥沙拉秦钠组无显著差异. 所以急性期溃结饮灌胃促进细胞增长和组织修复的效果略好于溃结饮灌肠. 第2周以后不同给药途径的作用差异逐渐明显, 不论是第2周末还是第4周末的实验结果都表明, 溃结饮灌肠促进结肠黏膜EGF表达的作用更为突出, 优于溃结饮

灌胃组. 因此, 不同给药途径作用于损伤肠黏膜EGF表达这一环节的作用是交叉的, 他们的起效时间点有一定差别. 溃结饮灌胃起效较早, 而且急性期效果占一定优势; 溃结饮灌肠起效较晚, 但从其作用开始发挥直至病程末期良好的促黏膜修复作用一直维持在较高水平. 由此可见联合应用两种给药方法, 并在病程急性期和中后期分别以口服和灌肠为主治疗本病, 可能会得到更好的效果, 更有效缩短黏膜修复时间, 加快溃疡愈合. 此实验结果与本课题另一实验内容中药溃结饮不同给药途径对大鼠UC血清IFN- $\gamma$ , IL-4浓度和IFN- $\gamma$ /IL-4比值的影响结果是一致的, 起到了相互印证的作用.

#### 4 参考文献

- 1 谭丹, 王新月, 田德禄, 李澎涛, 金美花. 溃结饮对UC大鼠血清EGF含量的影响. *中国实验方剂学杂志* 2002; 8: 39-40
- 2 Ishikawa S, Cepinskas G, Specian RD, Itoh M, Kvietys PR. Epidermal growth factor attenuates jejunal mucosal injury induced by oleic acid: role of mucus. *Am J Physiol* 1994; 267: G1067-1077
- 3 Mazumdar S, Das KM. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 176-181
- 4 Sinha A, Nightingale J, West KP, Berlanga-Acosta J, Playford RJ. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *N Engl J Med* 2003; 349: 350-357

电编 张敏 编辑 王晓瑜