

康复新联合 5-ASA 对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 IFN- γ 、IL-4 和 IL-12 表达的影响

郭艳娥 霍丽娟

【摘要】 目的 观察康复新、5-ASA 及两者联合用药治疗大鼠溃疡性结肠炎(UC)的疗效。方法 采用 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-TNBS)复制大鼠 UC 模型, 并随机将其分为正常对照组、模型组、5-ASA 治疗组、康复新治疗组以及联合治疗组, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 的水平、采用免疫组织化学法检测大鼠结肠黏膜中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 的表达、实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测结肠黏膜中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA 的表达。结果 与模型组相比, 康复新、5-ASA、联合治疗组大鼠血清中 IL-12、IFN- γ 的表达降低($P < 0.01$), IL-4 的表达升高($P < 0.01$); 与康复新组和 5-ASA 组相比, 联合治疗组大鼠血清中 IL-12 和 IFN- γ 的水平表达明显下降($P < 0.01$), 而 IL-4 的表达水平明显升高($P < 0.01$)。康复新组与 5-ASA 组比较无显著差异($P > 0.05$)。结论 康复新可作为一种治疗大鼠 UC 的药物, 且疗效与 5-ASA 相当, 与 5-ASA 联合应用可达到最佳的治疗效果。

【关键词】 康复新; 氨基水杨酸类; 结肠炎, 溃疡性; 干扰素 II 型; 白细胞介素 4; 白细胞介素 12

Effects of combined therapy with Kangfuxin and 5-ASA on the expression of IFN- γ , IL-4, IL-12 in rats with ulcerative colitis GUO Yan-e, HUO Li-juan. Department of Gastroenterology, the First Clinical Medicine College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: HUO Li-juan, Email: mymail5296@163.com

【Abstract】 Objective The research is to observe the efficacy of Kangfuxin, 5-ASA respectively as well as that of the two combined in ulcerative colitis (UC) in rats. **Methods** After the UC model being induced in the adult Waster rats through 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), the rats are randomly divided into five groups: the normal group, the model group, the 5-ASA group, the Kangfuxin group and the combined group. Then enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and immunohistochemistry are adopted to examine the level and expression of IFN- γ , IL-4, IL-12; Real-time PCR is used to determine their mRNA expressions. **Results** Compared with model group, IL-12 and IFN- γ expressions of the Kangfuxin, 5-ASA and combined groups decreased ($P < 0.01$), while their IL-4 expression increased ($P < 0.01$). Compared with the KangFuxin and 5-ASA groups, IL-12 and IFN- γ expression of the combined group decreased significantly ($P < 0.01$), while its expression of IL-4 rose tremendously($P < 0.01$). The Kangfuxin group and the 5-ASA group showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** As an effective drug therapy for UC, Kangfuxin's efficacy is similar to 5-ASA. The combined therapy of the two seems to be superior to single-agent therapy.

【Key words】 Kangfuxin; Aminosalicilyc acids; Colitis, ulcerative; Interferon type II; Interleukin-4; Interleukin-12

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病目前认为主要与环境、遗传、感染、免疫等因素有关^[1]。其中免疫反应异常是UC发病的主要因素, 而免疫反应是受细胞因子调节的, 其中 γ 干扰素(IFN- γ)、白细

胞介素-4(IL-4)、和白细胞介素-12(IL-12)是目前被公认的能介导UC发病的主要细胞因子。而目前治疗UC的主要药物是氨基水杨酸类制剂, 包括柳氮磺吡啶和 5-ASA 制剂, 康复新液主要成分为多元醇类及肽类活性物质, 具有促进肉芽组织增长, 促进血管新生, 加速坏死组织脱落, 修复溃疡及创面, 消除炎性水肿, 提高巨噬细胞吞噬功能, 增强机体免疫及调节机体的生理平衡等作用。白班俊等^[2]尝试应用康复新联合

5-ASA治疗UC患者,其疗效得到肯定。本文通过观察应用康复新、5-ASA及两者联合治疗大鼠UC前后血清IFN- γ 、IL-4、IL-12水平、结肠黏膜中IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA表达水平的变化,进一步探讨IFN- γ 、IL-4、IL-12在UC发病中的作用机制以及康复新、5-ASA以及两者联合治疗UC的疗效,为临床寻找新的治疗UC的方法提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物

雄性SD大鼠50只,体重(220±10)g,购自山西医科大学实验动物中心。

二、主要试剂和药物

康复新液(含肽类、多元醇类、黏糖氨酸、粘氨酸、多种氨基酸)由四川好医生攀西药业有限责任公司生产;5-ASA由山西省三九同达药业有限公司生产;IFN- γ 、IL-4、IL-12 ELISA、免疫组织化学试剂盒、PCR引物、Total RNA提取试剂盒均由武汉市博士德有限公司提供。

三、实验动物分组及给药方法

随机选取10只大鼠作为对照组,以0.6 ml生理盐水经导管导入结肠,1次/d;另外参照40只大鼠以5% TNBS与无水乙醇配成体积比1:1的混合液0.6 ml经导管导入结肠,1次/d^[3]。灌肠7 d证实造模成功后,将40只大鼠随机分为模型组、康复新治疗组、5-ASA治疗组及联合用药组(5-ASA+康复新),其中对照组和模型组大鼠予生理盐水(5 ml/kg)灌肠,1次/d;其余各组予康复新液、5-ASA溶液(5 ml/kg)灌肠,1次/d;联合用药组每日定时予5-ASA溶液(5 ml/kg)、8 h后予康复新液(5 ml/kg)灌肠,用药7 d。

四、标本采集

将各组大鼠用2%戊巴比妥液腹腔注射麻醉,取腹正中切口,腹主动脉采血,留取血清备用;自肛门处2~8 cm处取结肠,剖开展平,肉眼和光镜下观察结肠黏膜的变化,留取部分结肠黏膜组织备用。

五、指标检测

1. 血清IFN- γ 、IL-4、IL-12的测定:采用ELISA法:(1)标准品液配制。(2)洗涤液的配制。(3)一抗工作液的配制。(4)加样、洗板、加入一抗工作液、加酶标抗体工作液、加入底物工作液、加入终止液混匀,在30 min内用酶标仪在450 nm处测吸光值。(5)结果判定:所有OD值都应减除空白值后再行计算。以标准品浓度作横坐标,以其OD值作纵坐标,用ELISA软件绘制标准曲线,输入各个样本OD值获得相应的IL-12、IL-4、IFN- γ 浓度值。

2. 结肠黏膜组织IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA水平测定:(1)总RNA提取。(2)RNA浓度测定。(3)反转录反应。(4)Real-time PCR:①配制Real-time PCR反应体系。②轻弹管底将溶液混合,短暂离心。③各样品目的mRNA和内参(β -Actin)分别进行Real-time PCR反应。条件如下:95℃ 30 s,95℃ 5 s,59℃ 1 min,共40个循环。④数据分析: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-Actin}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{模型组}} - \Delta Ct_{\text{正常对照组}}$,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示结果。实验重复3次。

3. 结肠黏膜组织IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA水平测定:(1)封闭;(2)一抗孵育;(3)二抗孵育;(4)增强化学发光显影;(5)免疫组化计数标准:采取图像分析技术,光镜高倍视野($\times 400$)下观察含IFN- γ 、IL-4、IL-12的阳性细胞数。IFN- γ 、IL-4、IL-12的阳性表达表现为细胞核和胞质均呈棕黄色,以胞核为主。阳性着色细胞主要为血管内皮细胞,黏膜上皮细胞和单核细胞,多见于黏膜和黏膜下层。IFN- γ 、IL-4、IL-12的阳性表达判断标准:每张切片随机选择5个高倍视野,记数1000个细胞,计算阳性细胞百分比作为阳性表达的判定标准。

六、统计学分析

用SPSS 13.0软件包进行处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行多组资料的统计,两组资料的比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 动物模型一般情况:对照组大鼠均无腹泻及便血,体重增加明显;模型组大鼠2只因症状严重,3 d后死亡,剩余8只在1~3 d内出现不同程度血性腹泻、常蜷缩而卧、饮食量减少、体重下降;5-ASA组与康复新组出现血性腹泻程度较轻,体重下降,饮食量减少;联合组大鼠体重下降不明显,无血便,饮食量增加。

2. 病理学改变:大体病理即肉眼下可见33只大鼠结肠黏膜弥漫性充血、水肿,表面呈细颗粒状,脆性增加,糜烂及溃疡;另5只大鼠结肠黏膜有充血、水肿,无溃疡形成。正常对照组大鼠结肠黏膜上皮无充血、水肿。光镜下可见33只成模组大鼠结肠黏膜上皮糜烂、溃疡形成,黏膜下组织水肿、血管充血、隐窝脓肿,固有层有弥漫性中性粒细胞、淋巴细胞浸润,细胞更趋向嗜碱性和未成熟的细胞;另5只未完全成模组大鼠结肠黏膜有糜烂,无溃疡形成,肠黏膜上皮细胞坏死脱落,黏膜下淋巴细胞增生。正常对照组大鼠结肠黏膜上皮无糜烂、溃疡,黏膜下亦无隐窝脓肿,

仅见少量炎细胞浸润。

3. ELISA 检测各组大鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 的水平: 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 IL-12、IFN- γ 蛋白水平升高, IL-4 的水平下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 康复新、5-ASA 以及联合治疗组大鼠血清中 IL-12、IFN- γ 的水平降低 ($P < 0.01$), IL-4 的水平升高 ($P < 0.01$)。康复新组与 5-ASA 组相比, 两组大鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 的水平均无明显差异 ($P > 0.05$)。与康复新组和 5-ASA 组相比较, 联合治疗组大鼠血清中 IL-12 和 IFN- γ 的水平明显下降 ($P < 0.01$), 而 IL-4 的水平明显升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IFN- γ	IL-4	IL-12
对照组	10	15.632 \pm 0.867	23.762 \pm 4.534	26.958 \pm 2.270
模型组	8	101.702 \pm 2.286 ^a	1.740 \pm 0.625 ^a	84.739 \pm 5.024 ^a
康复新组	10	42.932 \pm 2.597 ^b	3.377 \pm 0.339 ^b	66.323 \pm 5.584 ^b
5-ASA 组	10	33.728 \pm 2.093 ^b	4.584 \pm 0.278 ^b	58.032 \pm 2.283 ^b
联合治疗组	10	26.427 \pm 1.536 ^{bc}	13.936 \pm 1.092 ^{bc}	38.400 \pm 5.142 ^{bc}
F 值		2744.802	687.987	132.539
P 值		0.000	0.000	0.000

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$; 与康复新组和 5-ASA 组相比较, ^c $P < 0.01$

4. RT-PCR 检测各组大鼠结肠黏膜组织中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA 的水平: IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA 水平与其蛋白水平相一致。与模型组相比, 5-ASA 治疗组、康复新治疗组以及联合用药组, 大鼠结肠黏膜中 IFN- γ 、IL-12 mRNA 的表达水平降低 ($P < 0.01$), IL-4 mRNA 的表达水平升高 ($P < 0.01$); 康复新组与 5-ASA 组相比, 两组大鼠结肠黏膜中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA 的表达水平均无明显差异 ($P > 0.05$)。与康复新和 5-ASA 组相比, 联合用药组大鼠结肠黏膜组织中 IFN- γ 、IL-12 mRNA 的表达水平下降 ($P < 0.01$), IL-4 mRNA 的表达水平升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠结肠黏膜中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IFN- γ	IL-4	IL-12
对照组	10	0.079 \pm 0.015	3.212 \pm 0.033	0.055 \pm 0.005
模型组	8	3.937 \pm 0.134	0.094 \pm 0.002	2.853 \pm 0.191
康复新组	10	1.464 \pm 0.267	0.887 \pm 0.049	0.939 \pm 0.047
5-ASA 组	10	1.493 \pm 0.095 ^a	0.910 \pm 0.040 ^a	1.196 \pm 0.232 ^a
联合治疗组	10	0.180 \pm 0.026	1.833 \pm 0.375	0.180 \pm 0.009
F 值		751.616	392.351	424.971
P 值		0.000	0.000	0.000

注: 与康复新组比较, ^a $P > 0.05$; 其余各组两两比较, $P < 0.01$

5. 免疫组织化学法检测各组大鼠结肠黏膜组织中

IFN- γ 、IL-4、IL-12 的水平: IFN- γ 、IL-4、IL-12 水平与 mRNA 水平相一致。与模型组相比, 5-ASA 治疗组、康复新治疗组以及联合用药组, 大鼠结肠黏膜中 IFN- γ 、IL-12 的表达水平降低 ($P < 0.05$), IL-4 的表达水平升高 ($P < 0.05$); 康复新组与 5-ASA 组相比, 两组大鼠结肠黏膜中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 的表达水平均无明显差异 ($P > 0.05$)。与康复新和 5-ASA 组相比, 联合用药组大鼠结肠黏膜组织中 IFN- γ 、IL-12 的表达水平下降 ($P < 0.05$), IL-4 的表达水平升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠结肠黏膜组织 IL-12、IL-4、IFN- γ 的表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性率百分比(%)		
		INF	IL-4	IL-12
对照组	10	4.60 \pm 0.72	30.43 \pm 2.70	14.47 \pm 0.70
模型组	10	19.80 \pm 11.00	10.33 \pm 0.50	29.27 \pm 1.40
5-ASA 组	10	9.13 \pm 0.42 ^a	20.33 \pm 0.50 ^a	16.07 \pm 1.50 ^a
康复新组	10	9.03 \pm 0.35 ^a	18.77 \pm 1.15 ^a	16.17 \pm 1.21 ^a
联合治疗组	10	6.40 \pm 0.36	27.33 \pm 2.29	12.83 \pm 0.38
F 值		268.50	645.24	125.54
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 康复新组与 5-ASA 组比较, ^a $P > 0.05$; 其余各组两两比较, $P < 0.01$

讨 论

免疫调节异常在 UC 发生中起着重要作用, 而对于促炎因子与抗炎细胞因子的研究极大地推动了 UC 发病机制的研究和相应治疗的进展^[4]。另外, 以 2, 4, 6-TNBS 联合造模法制作的大鼠 UC 模型的病理变化与人类 UC 相似, 既符合免疫反应模型的要求, 又适用于 UC 抗炎药物疗效的研究, 此法成功率高, 重复性好, 症状典型, 因而是一种较为理想的 UC 模型^[5]。

现已证实^[6], 如果促炎因子与抗炎的失衡可导致 UC 的发生。到目前为止, 促炎因子 IFN- γ 、IL-12 等能介导 UC 发病已得到公认。IL-12 主要是由激活的炎性细胞产生的, 并发现它依赖于 IFN- γ 和来自 T 细胞的信号。在炎症和 Th1 应答中, IFN- γ 与 IL-12 生成的能力形成正反馈机制^[7]。目前已知, IFN- γ 是一个具有多种生物学活性的细胞因子, 是一个炎症介导体, 也是一个促炎细胞因子级联反应的终末产物, 增高的 IFN- γ 可刺激血液中和(或)炎症局部中性粒细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞等分泌 IL-12, 且淋巴细胞固有层产生的 IFN- γ 也会募集细胞进入黏膜固有层并激活固有层细胞, 从而使 IL-12 的释放和产生增多, 引起级联反应, 最终导致最初的炎症信号进一步扩大, 最终导致 UC 的发生^[8]。此外, IL-4 是 T 细胞来源的细胞因子, 具有多种生物学功能, 最受关注

的是其抑制炎症的特性。IL-4能抑制IL-1、IL-8等促炎症性细胞因子和前列腺E2的产生,具有下行调节作用,IFN- γ 还是IL-4的拮抗因子,局部IFN- γ 产生是黏膜炎症过程中,由于上皮通透性增加通过上皮的ICAMA-1诱导促进了产生抗原的单核细胞恢复和促进多核巨细胞的增殖所致,随着IFN- γ 的含量明显升高,IL-4明显减少,从而进一步促使UC的发生。庞艳华等^[9]实验结果证实,UC患者结肠黏膜组织中IL-12的表达较正常对照组增加。研究发现正常人肠道黏膜淋巴细胞和上皮细胞于生理情况下能自发分泌一定量的IFN- γ ,提示IFN- γ 在维持正常黏膜免疫方面起一定作用。

目前,IL-4与UC的密切关系也得到公认。IL-4具有多种生物学功能,最主要的是抑制炎症的特性。IL-12可有效地促进IFN- γ 的产生,另一方面又可抑制IL-4的产生,随着IL-4水平的逐渐降低,其抑制炎症反应的作用减弱,从而促使UC疾病的发展。可见,IL-4与UC的发病有关,但是确切的作用机制还不明确。有研究表明^[10-11],UC患者结肠黏膜IL-4表达明显降低。

总之,促炎因子与抑炎因子的失衡,导致UC的发生。本实验结果显示,UC大鼠血清中IFN- γ 、IL-4、IL-12的蛋白水平及结肠黏膜组织中IFN- γ 、IL-4、IL-12 mRNA的表达与正常对照组相比,均有显著差异($P < 0.05$),且与病情变化密切相关。与既往研究结果一致,进一步证实IL-4、IL-12促进UC的发生,而IL-4具有保护作用。

目前UC治疗以氨基水杨酸类药物或合用免疫抑制剂为主,长期服用不良反应多,临床应用受到一定限制。近年来,人们开始尝试应用中成药制剂,中医药安全性高,价格相对低廉,在UC治疗中的优势和特色得到体现和重视,已成为本病主要治疗方法之一。康复新液^[12]是从昆虫蜚蠊药材提取液中分离、精制而成的生物制剂。该药主要成分为多元醇类及肽类活性物质,含18种氨基酸。具有促进肉芽组织增长,促进血管新生,加速坏死组织脱落,修复溃疡及创面,消除炎性水肿,提高巨噬细胞吞噬功能,增强机体免疫及调节机体的生理平衡等作用。药理研究证实康复新液能通过分泌IFN- γ 、IL-4、IL-12、前列腺素和白三烯

等活性物质来调节炎症。

本实验分别从蛋白及基因水平观察治疗大鼠UC前后IFN- γ 、IL-4、IL-12水平变化,寻求其最佳治疗方案,为临床治疗UC提供理论依据。实验结果表明,康复新可通过降低大鼠结肠黏膜IL-12、IFN- γ ,提高IL-4的表达来保持促炎因子与抑炎因子的平衡,这在一定程度上起到了治疗大鼠UC的作用,且与5-ASA疗效相当。本研究通过观察康复新联合5-ASA治疗UC的效果,结果表明,联合用药较单独用药,疗效显著,差异有统计学意义。

综上所述,康复新可作为一种辅助用药,用于治疗大鼠UC,疗效与5-ASA相当,与5-ASA联合应用可达到更好的治疗效果。

参 考 文 献

- [1] AI Thompson, CW Lees. Genetics of ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2011, 17: 831-848.
- [2] 白班俊, 黄国美, 朱莉益. 康复新液联合美沙拉秦治疗68例溃疡性结肠炎的临床疗效. *华西药理学杂志*, 2012, 27: 728.
- [3] 王皓, 欧阳钦, 胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立. *胃肠病学和肝病杂志*, 2001, 6: 7124-7125.
- [4] 罗凤燕, 白爱平. 溃疡性结肠炎动物模型的研究进展. *世界华人消化杂志*, 2013, 21: 607-613.
- [5] Oz HS, Chen T, de Villiers WJ. Green Tea Polyphenols and Sulfasalazine have Parallel Anti-Inflammatory Properties in Colitis Models. *Front Immunol*, 2013, 6: 294-303.
- [6] Battaglia M, Roncarolo MG. Immune intervention with T regulatory cells: Past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. *Elsevier*, 2011, 3: 182-194.
- [7] Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Mol Ther*, 2009, 6: 77-97.
- [8] Petricevich VL. Scorpion venom and the inflammatory response-Mediators of inflammation. *Neuroimmunomodulation*, 2010, 11: 1155-1159.
- [9] 庞艳华, 郑长青, 王铁淳, 等. IL-4和IL-13在溃疡性结肠炎中的表达. *胃肠病学和肝病杂志*, 2005, 14: 410-412.
- [10] Ooi CJ, Fock KM, Makharia GK, et al. The Asia-Pacific consensus on ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 6: 453-468.
- [11] Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon γ production in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2009, 12: 1629-1639.
- [12] Jiang LY, Liu X, Xia CL, et al. Research advance on chemical constituents and anti-tumor effects of *periplaneta americana* L. *Medicinal Plant*, 2012, 5: 95-97.

(收稿日期: 2013-10-15)

(本文编辑: 马超)