

• 药理 •

参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠结肠 IL-13 , IL-23 及 COX-2 ,CREB 表达的影响

丁凌辉¹, 贾育新^{1*}, 成映霞¹, 马文², 段永强¹, 明海霞¹, 万生芳¹, 程小丽¹

(1. 甘肃中医药大学 基础医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 观察参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织白细胞介素(IL) -13 ,IL-23 及环氧合酶-2 (COX-2) ,cAMP 反应元件结合蛋白(CREB) 表达的影响, 探究其对溃疡性结肠炎作用机制。方法: 将 48 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 分别是空白组、模型组、参苓白术散高、中、低剂量组和美沙拉秦组, 每组 8 只, 雌雄各半。除空白组, 其余各组采用病证结合法复制脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠模型, 即饮食、环境干预等措施联合 2,4-二硝基苯磺酸灌肠。造模成功后, 参苓白术散高、中、低剂量组分别按照 24, 12, 6 g·kg⁻¹·d⁻¹, 美沙拉秦组 0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹ 进行灌胃。连续灌胃 21 d 后采用酶联免疫吸附法(ELISA) 检测大鼠结肠组织 IL-13 ,IL-23 含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR) 检测结肠组织 IL-13 ,IL-23 ,COX-2 ,CREB mRNA 表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot) 检测结肠组织 COX-2 ,CREB 蛋白表达量。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠结肠 IL-13 含量和 IL-13 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$), IL-23 含量和 IL-23 mRNA 升高($P < 0.05$), COX-2 ,CREB mRNA 及蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 参苓白术散(高、中、低剂量) 组大鼠结肠 IL-13 含量和 IL-13 mRNA 表达均升高, 尤以参苓白术散高剂量组最显著($P < 0.05$), IL-23 含量和 IL-23 mRNA 降低($P < 0.05$), COX-2 ,CREB mRNA 表达及蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。结论: 参苓白术散可能调节脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠结肠 IL-13 ,IL-23 及 COX-2 ,CREB 的表达, 减少结肠的炎症反应。

[关键词] 参苓白术散; 溃疡性结肠炎; 白细胞介素-13 (IL-13); 白细胞介素-23 (IL-23); 环氧合酶-2 (COX-2); cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R2-0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0067-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181058

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1029.018.html>

[网络出版时间] 2018-3-9 11:05

Effect of Shenling Baizhu San on Expressions of IL-13 , IL-23 and COX-2 , CREB in Ulcerative Colitis Rats with Spleen Deficiency and Dampness

DING Ling-hui¹, JIA Yu-xin^{1*}, CHENG Ying-xia¹, MA Wen², DUAN Yong-qiang¹,
MING Hai-xia¹, WAN Sheng-fang¹, CHENG Xiao-li¹

(1. Basic Medical College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine ,
Lanzhou 730000 , China; 2. Gansu Provincial People's Hospital , Lanzhou 730000 , China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shenling Baizhu San on the expressions of interleukin (IL) -13 ,IL-23 and cyclooxygenase-2 (COX-2) ,cAMP response element binding protein (CREB) in ulcerative colitis rats with spleen deficiency and dampness , in order to explore its mechanism. **Method:** Totally 48 SPF Wistar rats were randomly divided into 6 groups: blank group , model group , high , medium and low-dose Shenling

[收稿日期] 20171107(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360518)

[第一作者] 丁凌辉, 在读硕士, 从事中医证候理论及其研究, E-mail: 690340813@qq.com

[通信作者] * 贾育新, 硕士生导师, 教授, 副主任医师, 从事中医证候理论及其研究, E-mail: xinyujia@163.com

Baizhu San groups , and mesalazine group , with 8 rats in each group , half male and half female. Except for blank group , the rats in the other groups were included into the saphenous ulcerative colitis model by the combination of disease and syndrome , including diet , environmental intervention and 2 , 4-dinitrobenzene sulfonic acid enema. After successful modeling , Shenling Baizhu San group was respectively treated with the drug at high dose , middle dose and low dose (24 , 12 , 6 g·kg⁻¹·d⁻¹) , and mesalazine group was treated with the drug (0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹) for gavage. After 21 days of treatment , the levels of IL-13 and IL-23 in colonic tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ; mRNA expressions of IL-13 , IL-23 , COX-2 , CREB in colonic tissues were detected by Real-time PCR ; the protein expressions of COX-2 , CREB in colonic tissues were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group , the model group rats' IL-13 content and IL-13 mRNA expression in colon were significantly decreased ($P < 0.05$) , IL-23 content and IL-23 mRNA expression increased ($P < 0.05$) , COX-2 , CREB mRNA expression and relative protein expression increased ($P < 0.05$) . Compared with the model group , IL-13 and IL-13 mRNA expressions in the colonic group were significantly higher than the rats treated with Shenling Baizhu San (high , medium and low doses) , especially in the high-dose group ($P < 0.05$) , IL-23 content and IL-23 mRNA expression decreased ($P < 0.05$) , and COX-2 , CREB mRNA expressions and relative protein expression decreased ($P < 0.05$) . **Conclusion:** Shenling Baizhu San can strengthen spleen Qi and excrete moisture , which may regulate the expressions of IL-13 , IL-23 and COX-2 , CREB in the colon of rats with spleen deficiency and dampness , so as to treat colonic ulcer.

[Key words] Shenling Baizhu San ; ulcerative colitis ; interleukin-13 (IL-13) ; interleukin-23 (IL-23) ; cyclooxygenase-2 (COX-2) ; CAMP response element binding protein (CREB)

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis , UC) 属于炎症性肠病(inflammatory bowel disease , IBD) , 具有反复发作的特点 结肠病变局限于黏膜及黏膜下层 , 以腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重等为主要临床表现。UC 发病机制尚不清楚^[1] , 白细胞介素-13 (IL-13) 是 UC 中的关键效应 Th2 细胞因子 , 可影响上皮紧密连接、细胞凋亡和细胞恢复^[2] , IL-23 在肠黏膜中的过度表达可抑制抗炎因子 IL-10 的产生 , 削弱防御屏障^[3]。环氧合酶-2 (COX-2) 是一种与炎症反应有关的蛋白分子 , 可促进前列腺素的产生。p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 是 MAPK 家族成员之一 , 其被激活后可促使组织局部出现急性炎症和凋亡等病理改变 , 毕殿勇等^[4]发现参苓白术散有降低 p38 MAPK 蛋白含量和基因表达水平的调控作用 , 而环磷酸腺苷(cAMP) 反应元件结合蛋白(CREB) 作为其下游核转录因子 , 可调节细胞的基因转录^[5]。根据其临床特点 , 归属中医“肠澼”、“肠风”、“痢疾”、“泄泻”、“便血”等病证范畴。中医认为饮食不节、外感六淫之邪、七情内伤和先天禀赋不足等损伤后天之本 , 从而发为本病^[6] , 在诊疗过程中注重“辨证论治” , 明确证名、证候、证型 , 力求精准。脾居中焦 , 在消化系统疾病的中医病机认识上占有重要地位^[7] , 而脾虚湿困型为 UC 的临床常见证候之一^[8]。参苓白术散作为《太平惠民和剂局方》中治疗脾虚

湿困证的经典方剂 , 翁湘涛等^[9]通过参苓白术散加减与西药治疗 UC 临床疗效及安全性的 Meta 分析 , 发现参苓白术散安全性高 , 且能有效减少 UC 主证 , 如腹痛、腹泻、脓血便等的持续时间 , 其临床对 UC 疗效明显 , 但其药理机制有待探究。本实验观测各组大鼠结肠 IL-13 , IL-23 及 COX-2 , CREB 的表达 , 探讨参苓白术散对脾虚湿困型 UC 作用的分子机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 48 只 , SPF 级 , 雌雄各半 , 体质量(220 ± 20) g , 由中国农业科学院兰州兽医研究所提供 , 合格证号 SCXK(甘) 2015-0005 , 实验大鼠饲养于甘肃中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室 , 动物设施使用许可证号 SYXK(甘) 2015-0005-00000389 , 伦理审查编号 2016-104 , 所有大鼠实验结束后脱颈处死 , 并交由实验动物中心无害化处理。

1.2 药物与试剂 参苓白术散各味药物用量按照原方比例进行配伍 , 人参、炒白术、茯苓、山药、甘草、莲子、白扁豆、桔梗、薏苡仁、陈皮、砂仁各味比例为 5:5:5:5:3:3:4:2:3:2:2 , 饮片均由甘肃天士力中天药业有限责任公司提供 , 由甘肃中医药大学药学院李硕副教授鉴定为正品。先用 10 倍的水将上述药物浸泡 30 min , 第 1 次煎煮沸后再持续 40 min , 第 2 次用 8 倍的水煎煮沸后持续 30 min 2 次煎

煮的药液混合后用8层纱布过滤,水浴浓缩至生药含量为 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,灌胃时稀释到所需质量浓度。美沙拉秦肠溶片(恒诚制药集团淮南有限公司,批号1067141);2,4-二硝基苯磺酸(2,4-dinitrobenzenesulfonic acid, DNBS,美国Sigma公司,批号STBF7251V);水合氯醛(天津市凯信化学工业有限公司,批号20150328);大鼠IL-13,IL-23酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为201704,201705);逆转录试剂盒(美国Thermo公司,批号00464135);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(美国Promega公司,批号0000227638);凝胶制备试剂盒,BCA蛋白定量试剂盒,PIPA裂解液,脱脂奶粉(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20170302,20170305,20170309,909C056);蛋白免疫印迹法(Western blot)一抗COX-2,CREB(美国Abcam公司,批号分别为GR299479-2,GR304165-2);内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗,二抗(美国ImmunoWay公司,批号分别为B4501,B0201)。

1.3 仪器 CFX96型Real-time PCR仪,CHEMI DOC XRS型凝胶成像分析系统,10705型Benchmark Plus酶标仪,SD型Western blot电泳及转印系统(美国伯乐公司);SCIENTZ-48型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);CT14RD型高速低温离心机(上海天美生化仪器设备工程公司)。

2 方法

2.1 分组与模型制备 48只SPF级Wistar大鼠适应性喂养5 d后,按随机数字表法分为空白组、模型组、参苓白术散高、中、低剂量组、美沙拉秦组,每组8只,雌雄各半。参照相关文献[10-11]进行病证结合的脾虚湿困型UC大鼠模型的复建。除空白组,其余各组大鼠单日禁食不禁水,并予 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 纯净水($2\text{ mL}/\text{只}$)灌胃(ig)1次;双日自由饮食,并予精炼猪油($2\text{ mL}/\text{只}$) ig 1次;强迫大鼠每日站立于深 2 cm 的水中 8 h ,连续 20 d 。第21天禁食不禁水 24 h ,提拉大鼠尾部促其大便排空后,用 10% 的水合氯醛($4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,将聚丙烯管插入大鼠肛门 8 cm ,空白组按生理盐水 0.25 mL 灌肠,其余各组大鼠(DNBS+50%乙醇)溶液 0.25 mL (DNBS 30 mg 溶于50%乙醇 0.25 mL)灌肠,灌肠的同时缓慢将聚丙烯管向外拉,拔出管子后,倒提大鼠尾部 1 min ,注意防止液体流出。随后将其放回饲养笼内,待其自然苏醒,自由饮食。

2.2 给药 除空白组和模型组,参苓白术散高、中、低剂量组和美沙拉秦组均给药 21 d ,参苓白术散高、中、低剂量组分别予 $24,12,6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的中药煎剂 ig ,美沙拉秦组予 $0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的美沙拉秦肠溶片溶液 ig 1次/d。

2.3 标本采集与处理 在第42天末次干预后禁食不禁水 24 h ,称质量并记录体质量,腹腔注射 10% 的水合氯醛($4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,将大鼠脱颈处死,截取肛门上 8 cm 病变最显著处结肠, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理盐水清洗干净后分为3份,一份置于无酶冻存管内 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用于Real-time PCR及Western blot检测;一份结肠组织与生理盐水以 $1:9$ 的比例,用组织研磨器研磨后,以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,保留上清液 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于ELISA检测;一份置于 4% 多聚甲醛固定、石蜡切片、苏木精-伊红(HE)染色,便于光镜观察病理形态变化。

2.4 ELISA法检测结肠组织IL-13,IL-23含量 应用上海酶联生物科技有限公司的ELISA试剂盒,遵照说明书按步骤检测大鼠结肠组织匀浆液中IL-13,IL-23含量。将试剂盒和待测结肠上清液平衡至室温,稀释准备对照品和洗涤液,按要求加样、温育、洗涤、温育、洗涤、显色、终止。酶标仪内测定 450 nm 波长时各孔吸光度 A ,绘制标准曲线,计算样品浓度。

2.5 Real-time PCR检测结肠组织IL-13,IL-23,COX-2,CREB mRNA的表达 取大鼠结肠组织 100 mg ,用经典的trizol法提取总蛋白,Bio-Rad核酸定量分析仪测定总RNA纯度(提取RNA $2.0 > A_{260}/A_{280} > 1.8$)。参照反转录试剂盒操作说明进行反转录合成cDNA,PCR扩增IL-13,IL-23,COX-2,CREB基因片段。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。IL-13上游 $5'\text{-AGCATGGTATGGAGCGTGGAC-3'}$,下游 $5'\text{-GCATTGCAACTGGAGATGTTGG-3'}$,产物长度 83 bp ;IL-23上游 $5'\text{-CGTATCCAGTGTGTGATGGTT-3'}$,下游 $5'\text{-AAGATGTCCGAGTCCAGTAGGTG-3'}$,产物长度 119 bp ;COX-2上游 $5'\text{-TGAACACGGACTTGCTCACTTTG-3'}$,下游 $5'\text{-AGGCCTTTGCCACTGCTTGTA-3'}$,产物长度 107 bp ;β-actin上游 $5'\text{-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'}$,下游 $5'\text{-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'}$,产物长度 150 bp ;CREB上游 $5'\text{-ACAGTTCAAGCCCAGCCACAG-3'}$,下游 $5'\text{-GCACTAAGGTTACAGTGGGAGCAGA-3'}$,产物长度 94 bp 。PCR扩增条件为预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min ,变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 s ,退火

60 ℃ 60 s, 延伸 72 ℃, 1 min, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

2.6 Western blot 法检测结肠组织 COX-2, CREB 蛋白的表达 使用 RIPA 裂解液提取大鼠结肠组织蛋白, 根据 BCA 蛋白定量计算上样量, 然后跑胶 120 V, 90 min, 转膜 180 mA, 120 min, 封闭液摇床 2 h, 一抗 (COX-2, CREB, GAPDH 溶液配制分别为 1:500, 1:500, 1:1 500) 孵育 4 ℃ 过夜, TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 二抗 (辣根酶标记山羊抗兔 1:5 000) 孵育, 摇床 2 h。ECL 化学发光, 曝光, 用图像分析软件扫描灰度值, 然后对每组目标蛋白与 GAPDH 的灰度比值进行分析, 可作为目的蛋白的相对表达量。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据方差齐性检验结果, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般体征的影响 空白组大鼠精神状态良好, 反应灵敏, 饮食正常, 皮毛浓密且有光泽, 大便成形呈褐色。模型组在第 3~5 天即相继出现疲惫状态, 喜蜷缩静卧, 体质量稍有减轻, 但不明显, 第 10 天饮食减少, 精神萎靡, 轻微竖毛并有脱落现象, 便质变软, 第 15 天肛周污秽, 可见血便, 体质量减轻明显, 甚者体质量减轻高达 9%, 弓背眯眼, 皮毛色泽枯槁易脱落, 造模时间越长, 上述症状越显著。治疗组在药物干预后, 1 周后大鼠精神状态逐渐好转, 毛色恢复光泽, 脓血便消失, 体质量持平或有所增长, 上述症状尤以参苓白术散高剂量组好转明显。

3.2 对 UC 大鼠结肠组织 IL-13, IL-23 含量的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 IL-13 含量降低, IL-23 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 参苓白术散高、中、低组和美沙拉秦组 IL-13 含量升高, IL-23 含量显著降低, 尤以参苓白术散高剂量组效果明显 ($P < 0.05$); 参苓白术散高剂量组和美沙拉秦组无明显差异。见表 1。

3.3 对比大鼠结肠组织 IL-13, IL-23 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 IL-13 mRNA 降低明显 ($P < 0.05$), IL-23 mRNA 升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各干预组大鼠结肠组织中 IL-13 mRNA 升高 ($P < 0.05$), IL-23 mRNA 降低 ($P < 0.05$), 以参苓白术散高剂量组和美沙拉秦组作用最显著 ($P < 0.05$)。见表 2。

• 70 •

表 1 参苓白术散对 UC 大鼠结肠组织 IL-13, IL-23 的含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of Shenling Baizhu San on contents of IL-13 and IL-23 in colon of UC rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-13	IL-23
空白	—	31.71 $\pm$ 1.31	8.68 $\pm$ 3.14
模型	—	25.04 $\pm$ 2.19 ¹⁾	23.94 $\pm$ 3.35 ¹⁾
参苓白术散	24	34.66 $\pm$ 5.28 ²⁾	10.58 $\pm$ 2.28 ²⁾
	12	30.25 $\pm$ 4.30	13.93 $\pm$ 1.51 ²⁾
	6	26.88 $\pm$ 2.59	19.76 $\pm$ 2.83 ²⁾
美沙拉秦	0.2	36.15 $\pm$ 6.24 ²⁾	9.50 $\pm$ 2.22 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

表 2 参苓白术散对 UC 大鼠结肠组织 IL-13, IL-23 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of Shenling Baizhu San on expression of IL-13 and IL-23 mRNA in colon of UC rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-13	IL-23
空白	—	1.000 0 $\pm$ 0	1.000 0 $\pm$ 0
模型	—	0.082 6 $\pm$ 0.015 1 ¹⁾	3.521 5 $\pm$ 0.018 6 ¹⁾
参苓白术散	24	3.595 9 $\pm$ 0.003 5 ²⁾	1.296 8 $\pm$ 0.002 8 ²⁾
	12	2.684 7 $\pm$ 0.013 3 ²⁾	1.577 9 $\pm$ 0.019 1 ²⁾
	6	2.112 7 $\pm$ 0.011 0 ²⁾	1.637 5 $\pm$ 0.032 4 ²⁾
美沙拉秦	0.2	3.212 1 $\pm$ 0.010 5 ²⁾	0.084 1 $\pm$ 0.013 7 ²⁾

3.4 对 UC 大鼠结肠组织 COX-2, CREB mRNA 表达相对表达量的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 COX-2, CREB mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各干预组大鼠结肠组织中 COX-2, CREB mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 参苓白术散对 UC 大鼠结肠组织 COX-2, CREB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Shenling Baizhu San on expression of COX-2 and CREB mRNA in colon of UC rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

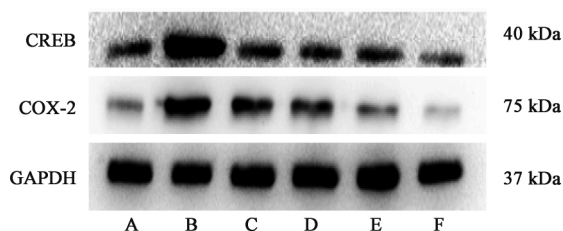
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	COX-2	CREB
空白	—	1.000 0 $\pm$ 0	1.000 0 $\pm$ 0
模型	—	7.081 9 $\pm$ 0.001 6 ¹⁾	2.859 2 $\pm$ 0.000 7 ¹⁾
参苓白术散	24	1.504 9 $\pm$ 0.004 2 ²⁾	1.350 8 $\pm$ 0.000 7 ²⁾
	12	2.200 8 $\pm$ 0.001 4 ²⁾	1.840 0 $\pm$ 0.000 1 ²⁾
	6	2.712 3 $\pm$ 0.010 6 ²⁾	2.821 9 $\pm$ 0.001 7 ²⁾
美沙拉秦	0.2	1.326 9 $\pm$ 0.023 3 ²⁾	0.091 3 $\pm$ 0.001 1 ²⁾

3.5 对 UC 大鼠结肠组织 COX-2, CREB 蛋白相对表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 COX-2, CREB 蛋白相对表达量均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠结肠组织中 COX-2, CREB 蛋白相对表达量均降低, 参苓白术散高剂量组尤为显著 ($P < 0.05$)。见表 4 图 1。

表 4 参苓白术散对 UC 大鼠结肠组织 COX-2, CREB 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 4 Effect of Shenling Baizhu San on relative expression of COX-2 and CREB protein in colon of UC rats ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	COX-2/GAPDH	CREB/GAPDH
空白	—	0.227 4 $\pm$ 0.007 4	0.390 3 $\pm$ 0.022 2
模型	—	0.849 3 $\pm$ 0.003 8 ¹⁾	0.913 5 $\pm$ 0.013 3 ¹⁾
参苓白术散	24	0.246 0 $\pm$ 0.003 4 ²⁾	0.309 3 $\pm$ 0.012 4 ²⁾
	12	0.408 4 $\pm$ 0.006 9 ²⁾	0.314 9 $\pm$ 0.007 0 ²⁾
	6	0.516 8 $\pm$ 0.016 2 ²⁾	0.408 2 $\pm$ 0.014 2 ²⁾
美沙拉秦	0.2	0.102 6 $\pm$ 0.001 6 ²⁾	0.321 7 $\pm$ 0.009 8 ²⁾



A. 空白组; B. 模型组; C. 参苓白术散 ($6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组; D. 参苓白术散 ($12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组; E. 参苓白术散 ($24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组; F. 美沙拉秦 ($0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组(图 2 同)

图 1 各组大鼠结肠组织 COX-2, CREB 蛋白表达电泳

Fig. 1 Expression of COX-2 and CREB protein in colon of each groups rats

3.6 对 UC 大鼠结肠组织形态的影响 空白组结肠组织切片 HE 染色, 镜下观察腺体结构完整, 无损伤, 模型组结肠组织结构杂乱, 黏膜层损伤严重, 腺体破碎, 黏膜下层有充血和水肿, 并可见炎性细胞浸润, 甚者损伤达肌层; 干预组(参苓白术散高、中、低剂量组和美沙拉秦组)有大量肉芽组织增生, 并有上皮再生, 但腺体结构不规整, 组织内仍可见少量炎性细胞浸润, 尤以参苓白术散高剂量组修复最好, 腺体较规整, 黏膜组织偶见水肿、充血及炎性细胞。见图 2。

4 讨论

溃疡性结肠炎是一种病因尚不明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病。这种疾病的发病率正在增加^[12], 近年来, 我国报道的 UC 病例明显增多^[13]。

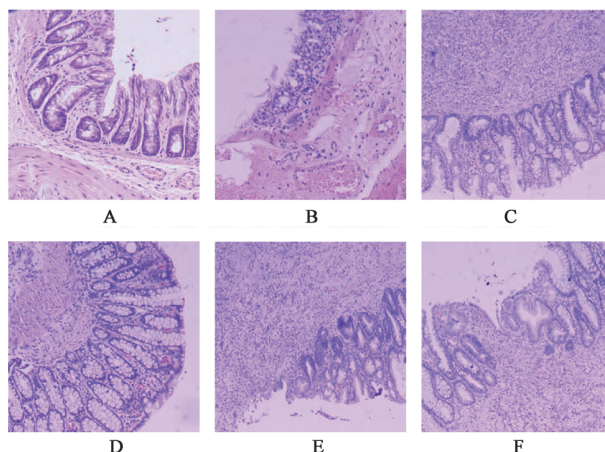


图 2 参苓白术散对 UC 大鼠结肠组织形态的影响(HE, $\times 100$)

Fig. 2 Effects of Shenling Baizhu San on colonic tissue in morphology(HE, $\times 100$)

脾虚湿困是 UC 常见的一种证型, 以纳呆、肠鸣泄泻、形体消瘦等为主要症状。参苓白术散以益气健脾的四君子汤为基础方, 人参、白术、茯苓、甘草甘温益气、健脾渗湿共助温补脾气; 薏苡仁助山药、白扁豆健脾止泻, 和中化湿; 莲子为补脾要药, 可健脾涩肠止泻; 砂仁理气醒脾; 配伍具有“载药上行”的桔梗, 加强升提上行之力。

IL-13 属于 Th2 型且具有抗炎作用的细胞因子。研究证实 IL-13 和 IL-4 共有受体, 而 IL-4 是调节细胞以及体液免疫的关键因子, 因此 IL-13 也有调节细胞以及体液免疫的功能^[14]。IL-23 属于 IL-12 家族细胞因子之一。它可以通过直接作用于 Th17 炎症细胞因子, 还可以通过阻碍抗炎机制的调节间接起到促炎作用^[15]。CREB 是各项信号通路中一种重要的信使。CREB 蛋白虽然仅是一种具有转录功能的蛋白, 但因其亚种类较多, 每一种类在机体对外界反应时都发挥了不同的作用, 机体内细胞的代谢和生长都需要 CREB 蛋白的辅助表达^[16]。COX-2 属于环氧合酶两种异构体之一, 不同于 COX-1 的稳定性, COX-2 是一种在细胞内外刺激作用下激活, 进而发挥病理生理作用的诱导酶。前列腺素(主要为前列腺素 2)是一种重要的炎症介质, 而 COX-2 是催化其合成和增加的主要原因, 造成 UC 患者腹痛腹泻。

本实验通过病证结合法制备脾虚湿困型 UC 大鼠模型, 此模型结合 DNBS 方法简便易操作, 且安全性高。研究结果表明, 参苓白术散可通过上调 IL-13, 抑制 IL-23, COX-2 的表达, 进而促进脾虚湿困型 UC 的结肠黏膜炎症减弱, 使其症状减轻。

[参考文献]

- [1] Scharl M, Rogler G. Inflammatory bowel disease pathogenesis: what is new? [J]. Curr Opin Gastroenterol 2012 28(4):301-309.
- [2] Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution [J]. Gastroenterology, 2005, 129(2): 550-564.
- [3] LIU Z, FENG B S, YANG S B, et al. Interleukin (IL)-23 suppresses IL-10 in inflammatory bowel disease [J]. J Biol Chem 2012 27(5):3591-3597.
- [4] 毕殿勇, 贾育新, 成映霞, 等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎模型大鼠 IL-1 β 、IL-4 及 p38 MAPK 基因蛋白表达的影响 [J]. 中药药理与临床 2017 33(1):7-11.
- [5] Mayo L D, Kessler K M, Pincheira R, et al. Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase [J]. J Biol Chem 2001 276(27):25184-25189.
- [6] 李睿瑛. 丁氏结灌肠液对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎大鼠肠道屏障作用的相关研究 [D]. 南京: 南京中医药大学 2017.
- [7] 王鹏. 溃疡性结肠炎的中医证候学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学 2014.
- [8] 岳宏, 王天芳, 陈剑明, 等. 溃疡性结肠炎常见中医证候及证候要素的现代文献研究 [J]. 北京中医药大学学报 2010 33(5):306-308.
- [9] 翁湘涛, 胡月, 廖柳, 等. 参苓白术散加减对比西药治疗溃疡性结肠炎的疗效和安全性 Meta 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志 2017 23(10):205-210.
- [10] 李姿慧, 王键, 蔡荣林, 等. 脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立与评价 [J]. 中西医结合学报 2012, 10(8):918-924.
- [11] Hawkins J V, Emmel E L, Feuer J J, et al. Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats [J]. Dig Dis Sci, 1997 42(9):1969-1980.
- [12] Ananthakrishnan A N. Epidemiology and risk factors for IBD [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2015, 12(4):205-217.
- [13] 王新月, 王建云. 溃疡性结肠炎中医药治疗的关键问题与优势对策 [J]. 中华中医药杂志, 2012 27(2):263-267.
- [14] 梁瑞峰, 葛文静, 王慧森, 等. 痛泻要方加减引经药防风对肠易激综合征大鼠内脏敏感性及脑肠轴不同靶点脑肠肽的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志 2018 24(2):152-157.
- [15] 农荣卯. 姜黄素对大鼠溃疡性结肠炎 IL-23/IL-17 表达的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学 2013.
- [16] 张耀人. 健脾益气方调控 NSAIDs 胃粘膜损伤 COX-2 信号中 CREB 蛋白通路转导研究 [D]. 广州: 广州中医药大学 2014.

[责任编辑 全燕]