

云母对大鼠非甾体抗炎药相关小肠损伤的保护及对肿瘤坏死因子- α 、核因子- κ B 的影响

孟立娜 方 莉 吕 宾 吴炜烽

摘要 **目的** 观察云母对大鼠非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 相关小肠损伤的保护作用及其对炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、核因子- κ B (NF- κ B) 表达的影响, 探讨其肠黏膜保护的可能机制。**方法** 用小剂量双氯芬酸灌胃制备大鼠 NSAIDs 相关小肠损伤模型, 按随机数字表法将 24 只雄性 SD 大鼠随机分成 3 组: 空白组、模型组、云母干预组, 每组 8 只。空白组以 1 mL/(100 g·d) 生理盐水灌胃, 模型组以 7.8 mg/(kg·d) 双氯芬酸灌胃, 云母组于造模前 1 d 给予云母 120 mg/(kg·d) 灌胃, 造模当天起, 云母干预组每天 120 mg/(kg·d) 灌胃 1 h 后, 再以 7.8 mg/(kg·d) 双氯芬酸灌胃, 连续 5 d 后处死所有大鼠。观察大鼠小肠黏膜大体及组织学损伤并作评分, 放免法测定血清 TNF- α 变化, 免疫组化法检测肠上皮 NF- κ B 表达。**结果** 小剂量双氯芬酸可致大鼠肠黏膜损伤, 出现腹水, 腹膜粘连, 小肠黏膜红斑糜烂、多发溃疡、肠腔狭窄, 并可见穿孔等; 云母干预组大鼠肠黏膜损伤明显减轻, 腹腔炎症明显改善, 多以小肠黏膜局部充血水肿、糜烂为主。模型组大鼠小肠损伤大体评分 (4.38 ± 1.41) 及组织学评分 (4.00 ± 1.85) 均较空白组 (0.00 ± 0.00 ; 0.00 ± 0.00) 显著升高 (均 $P < 0.01$); 云母组小肠损伤大体评分 (1.25 ± 1.58) 及组织学评分 (1.75 ± 0.71) 均较模型组明显降低 ($P < 0.05$)。模型组血清 TNF- α 水平及肠黏膜 NF- κ B 表达明显高于空白组 (22.20 ± 5.42 vs 6.19 ± 2.76 , 5.75 ± 0.46 vs 1.38 ± 1.19 , $P < 0.01$, $P < 0.05$); 云母干预组大鼠的血清 TNF- α 水平 (9.61 ± 4.02) 及肠黏膜 NF- κ B 表达 (0.13 ± 0.35) 较模型组显著下降 ($P < 0.01$)。**结论** 云母可有效减轻大鼠 NSAID 相关小肠损伤, 可抑制小肠黏膜 NF- κ B 活性, 下调炎症因子 TNF- α 表达, 对 NSAIDs 所致小肠损伤具有防治作用。

关键词 非甾体抗炎药; 云母; 黏膜保护; 肿瘤坏死因子- α ; 核因子- κ B

Effect of Muscovite on Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Associated Intestinal Injury and Its Influences on Tumor Necrosis Factor- α and Nuclear Factor- κ B in Rats MENG Li-na, FANG Li, LU Bin, et al *Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006)*

ABSTRACT **Objective** To examine the efficacy of muscovite on non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) associated intestinal injury in rats, and its influences on the expressions of inflammatory factors, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nuclear factor- κ B (NF- κ B), for researching its possible mechanism of intestinal mucosal protection. **Methods** NSAID associated intestinal injury in rat was induced by intra-gastric infusion of diclofenac. Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly and equally assigned to three groups: normal control group, model control group and Muscovite group, 8 in each group. The normal control group received physiological saline 1 mL/100g and the other two groups received diclofenac 7.8 mg/kg respectively every day for 5 days; while to the Muscovite group, Muscovite 120 mg/kg was gastric infused once on the day before modeling, followed with 120 mg/kg per day, given an hour before diclofenac infusion in the modeling days. All rats were killed on the 6th day, their gross changes and histological injury of intestinal mucosa were observed and scored, serum level of TNF- α was assayed in radioimmunoassay and NF- κ B activity was determined by immunohistochemistry. **Results** The small dosage diclofenac administration can cause intestinal damage, revealing obviously erythema, erosion, multiple ulcer, intestinal stricture, even perforation, etc. Intestinal injury in the Muscovite group was obviously milder than that in the model control group, only showed changes of local congestion, e-

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金项目 (No. 2009B118)

作者单位: 浙江中医药大学附属第一医院消化科 (杭州 310006)

通讯作者: 孟立娜, E-mail: mln6713@163.com

dema and erosion. The scores of gross and histological intestinal features in the model control group were 4.38 ± 1.41 and 4.00 ± 1.85 , while in the Muscovite group were 1.25 ± 1.58 and 1.75 ± 0.71 , respectively, all higher than those in the normal control group (0.00 ± 0.00 and 0.00 ± 0.00 , $P < 0.01$ and $P < 0.05$), respectively, but the elevation in the model control group were more significant ($P < 0.05$). Similar results were shown in comparisons of TNF- α and NF- κ B levels between groups, the values were 6.19 ± 2.76 and 1.38 ± 1.19 in normal control; 22.20 ± 5.42 and 5.75 ± 0.46 in model control; 9.61 ± 4.02 and 0.13 ± 0.35 in the Muscovite group, respectively (all $P < 0.01$). **Conclusion** Muscovite could effectively reduce the NSAID associated intestinal mucosal injury by inhibiting the activity of NF- κ B in intestinal mucosa, and down-regulating the expression of TNF- α in blood plasma, so muscovite is proved to have protective function for intestine.

KEYWORDS non-steroidal anti-inflammatory drugs; Muscovite; mucosa protection; tumor necrosis factor- α ; nuclear factor- κ B

非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 具有解热、镇痛、消炎、抗风湿、抗血小板聚集等作用。NSAIDs 临床应用相当广泛, 现已成为全球使用最多的药物之一^[1]。然而 NSAIDs 所致的胃肠不良事件仍长期困扰临床医生及 NSAIDs 服用者。NSAIDs 相关胃肠并发症多无腹痛等临床症状, 常以出血、穿孔等并发症为首发表现^[2], 目前国内外尚缺乏防治这些不良事件的理想药物。记载有报道称云母治疗“脾虚泄泻”患者有良好疗效, 云母有黏膜保护作用, 可用于治疗胃溃疡和结肠炎^[3-5]。本研究利用小剂量双氯芬酸灌胃制备大鼠 NSAIDs 相关小肠损伤模型, 予中药云母进行干预, 研究云母对大鼠 NSAIDs 相关小肠损伤的保护作用, 观察大鼠炎症因子血清 TNF- α 、肠上皮 NF- κ B 表达变化, 为临床应用云母防治 NSAIDs 相关小肠损伤提供实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 8~9 周龄, 220~260 g (浙江中医药大学动物实验中心提供)。

2 药品及试剂 双氯芬酸缓释片 (北京诺华制药有限公司, 批号: X0222); 云母粉 (浙产绢云母组成, 江苏江阴中药厂制剂, 3 g/袋, 浙江省中医院中药房提供)。TNF- α 放射免疫分析药盒购自北京北方生物技术研究所; NF- κ B P65 亚单位一抗、DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 免疫组化 Envision 系统试剂盒购自 Dako 公司。

3 动物分组及造模方法 按随机数字表将 24 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组、模型组、云母干预组, 每组 8 只。造模药物双氯芬酸按照人类常规口服剂量折算成大鼠剂量为 $7.8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 双氯芬酸、云母分别溶于生理盐水, 配置成 $0.78 \text{ mg}/\text{mL}$ 双氯酚酸溶液和 $12 \text{ mg}/\text{mL}$ 云母溶液。空白组以 $1 \text{ mL}/(100 \text{ g} \cdot \text{d})$

生理盐水灌胃, 模型组以 $7.8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 双氯芬酸液灌胃, 云母干预组云母给药剂量参考王良静等^[4]研究, 于造模前 1 d 给予云母 $120 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 连用 5 d, 造模当天起, 每天 $120 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 云母灌胃 1 h 后, 再以 $7.8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 双氯芬酸灌胃。5 天后处死大鼠, 造模期间大鼠正常饮食饮水。

4 标本制备 末次给药 24 h 后, 以 3% 戊巴比妥钠 $0.15 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 腹腔注射麻醉处死大鼠, 打开腹腔, 取下腔静脉血 5 mL , 静置 20 min 后, $3000 \text{ r}/10 \text{ min}$, 取血清 -20°C 保存, 待测 TNF- α 。观察大鼠腹腔, 分离全段肠系膜, 剖开全部小肠, 进行大体观察; 距回盲部 40 cm 近侧端取空肠 1 cm , 用冰生理盐水冲洗干净后, 置 4% 甲醛液中固定, 常规石蜡包埋, 德国 LEICA RM2235 石蜡切片机切片, 厚度 $4 \mu\text{m}$, 进行 HE 染色, 组织学评分以及免疫组化法检测 NF- κ B。

5 检测指标

5.1 小肠黏膜大体评分 肠黏膜损伤大体形态评分按下列标准^[6]。0 分: 无损伤; 1 分: 局部充血、水肿但未出现溃疡; 2 分: 有溃疡, 但没有明显炎症; 3 分: 有溃疡, 仅有一处出现炎症; 4 分: 有多处溃疡和炎症, 溃疡大小 $< 1 \text{ cm}$; 5 分: 有多处溃疡和炎症: 至少有一处溃疡大小 $> 1 \text{ cm}$ 。

5.2 小肠黏膜组织学评分 4% 甲醛液固定空肠标本, 常规脱水石蜡包埋切片、HE 染色, 光镜下按 Chiu CT^[7] 法分级: 0 分: 肠黏膜绒毛正常; 1 分: 绒毛顶端上皮出现囊状间隙, 并伴有毛细血管充血; 2 分: 上皮间间隙扩大, 中度固有层水肿, 中央乳糜管扩张; 3 分: 固有层明显水肿, 肠黏膜上皮层细胞变性、坏死, 少数绒毛顶端脱落; 4 分: 上皮细胞层变性、坏死、脱落, 部分绒毛脱落; 固有层裸露, 毛细血管扩张、充血; 5 分: 绒毛脱落, 固有层崩解, 出血或溃疡形

成。光镜下每样本随机计数 20 个视野, 每个视野按标准进行单独评分, 20 个视野的平均数为最后病理评分。

5.3 放射免疫法检测血清 TNF- α 含量 由本院放免中心检测, 按照北京北方生物技术研究所提供的放免分析药盒说明书进行。

5.4 免疫组化法检测小肠黏膜 NF- κ B 表达 采用免疫组化 Envision 二步法进行(按试剂盒说明书)。主要步骤:石蜡切片常规脱蜡至水, EDTA/枸橼酸钠溶液浸泡, 微波炉处理进行抗原修复, 30 mL/L H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶 15 min, 滴加一抗(4℃过夜, 37℃复温 30 min), 滴加 Envision 二抗(37℃45 min), DAB 溶液显色 3~4 min, 苏木素复染 8 min, 盐酸酒精分化 40 s, 脱水透明及中性树胶封固。一抗、二抗均按 1:100 稀释, PBS 取代一抗作为空白对照。NF- κ B 阳性表达以胞核或胞核胞浆呈棕色颗粒状染色为标准, 着色明显高于背景或背景不着色而细胞着色者为阳性细胞。参照 Mattern J 等^[8]的方法进行 NF- κ B 阳性表达判定。每张切片按阳性细胞染色强度和阳性细胞百分数多少分级。阳性染色深度:未见染色为 0 分, 轻度染色为 1 分(染成浅黄色), 中度染色为 2 分(染成棕黄色), 深度染色为 3 分(染成棕褐色), ≥ 1 分为表达阳性;阳性细胞数记分:0%~1%为 0 分, 2%~25%为 1 分, 26%~50%为 2 分, 51%~75%为 3 分, 76%~100%为 4 分。阳性染色深度与阳性细胞百分数之和分 4 级:0~1 分阴性(-), 2~3 分弱阳性(+), 4~5 分中度阳性(++), 6~7 分强阳性(+++)。

6 统计学方法 实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 10.0 统计软件分析。方差齐两组间比较采用 t 检验, 方差不齐两组间比较采用近似 t 检验, 等级资

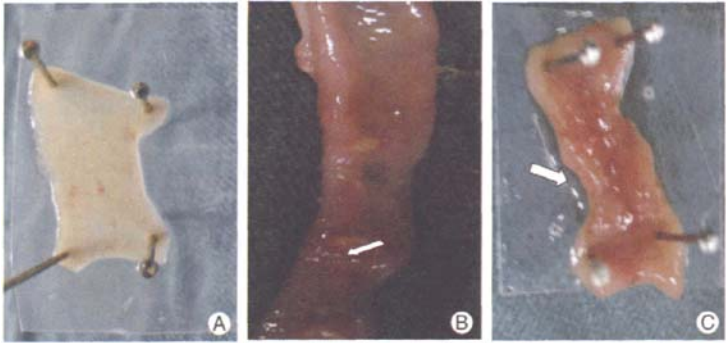
料两组间比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 造模 5 天后, 空白组及云母组大鼠全部存活, 造模第 1 天大鼠食欲良好, 大便成形, 体重增长速度快;云母组部分大鼠较造模第 1 天活动稍迟钝, 部分大鼠解稀便, 无黑便。造模第 3 天开始模型组大鼠摄食减少, 懒动拱背, 毛发枯黄, 缺乏光泽, 大便减少, 部分大鼠消瘦, 腹壁毛发湿透;造模第 4 天模型组大鼠死亡 2 只, 死于肠道出血、穿孔, 尸检分别为:打开腹腔可见少量腹水, 小肠肠管扩张明显, 见溃疡穿孔;腹腔内中等量腹水, 小肠肠壁充血水肿, 部分肠管出血。造模第 5 天模型组 3 只大鼠濒临死亡, 即予抽血、解剖, 留取标本。

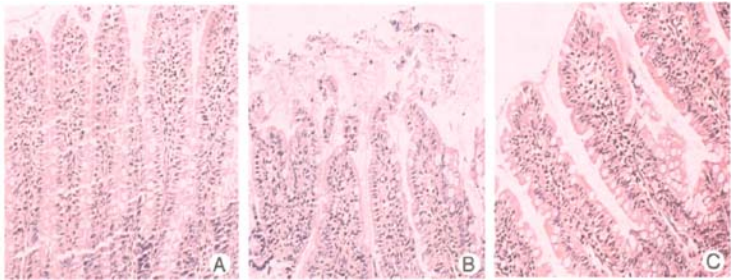
2 各组小肠黏膜大体评分比较(图 1) 空白组大鼠未出现肉眼可见损伤;模型组大鼠腹水较多, 小肠黏膜充血发红, 局部增厚及多发溃疡形成, 部分肠管发生穿孔, 坏死黑变;云母干预组打开腹腔见少到中等量腹水, 该组大鼠多表现为黏膜局部充血水肿, 可见肠壁散发小溃疡, 最大纵径 < 1 cm, 仅 1 只大鼠发生肠粘连, 肠管扩张, 未见穿孔, 死亡大鼠按照最大分值统计。模型组大体损伤评分(4.38 ± 1.41)明显高于空白组(0.00 ± 0.00), 差异有统计学意义($P < 0.01$);云母干预组(1.25 ± 1.58)则较模型组显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 各组小肠黏膜组织学评分比较(图 2) 模型组小肠黏膜组织形态异常, 绒毛中心分离坏死、脱落, 固有层崩解, 出血伴溃疡形成, 黏膜下大量中性粒细胞浸润(死亡大鼠按 Chiu 氏分级最高级统计), 其组织学评分(4.00 ± 1.85)明显高于空白组(0.00 ± 0.00),



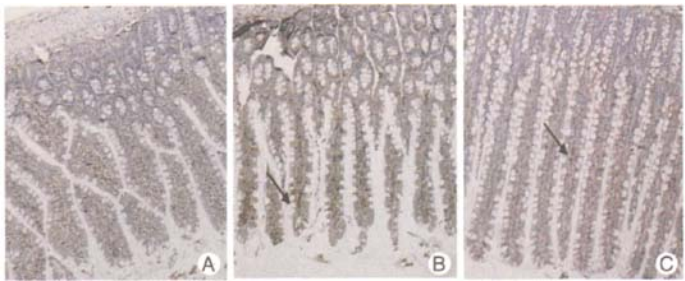
注: A 为空白组, 小肠黏膜无明显肉眼损伤; B 为模型组, 小肠黏膜充血发红, 局部增厚及多发溃疡形成; C 为云母干预组, 小肠黏膜有局部充血水肿

图 1 各组大鼠小肠损伤大体观



注:A 为空白组,小肠黏膜组织形态正常,绒毛完整;B 为模型组,小肠绒毛中心坏死脱落,固有层崩解,出血伴溃疡形成,间质有充血、水肿;C 为云母干预组,小肠绒毛结构基本完整,黏膜下可见轻中度炎性改变及肉芽组织形成

图 2 各组大鼠小肠黏膜组织学表现 (HE, ×200)



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为云母干预组

图 3 各组大鼠小肠黏膜 NF-κB 表达(SP, ×100)

$P < 0.01$);云母干预组小肠黏膜表现为轻度炎性改变,可见部分再生上皮,绒毛基底部极少见分离,其组织学评分(1.75 ± 0.71)明显低于模型组($P < 0.05$)。

4 血清 TNF- α 水平变化 模型组大鼠血清 TNF- α (22.20 ± 5.42)表达较空白组(6.19 ± 2.76)明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);云母干预组血清 TNF- α (9.61 ± 4.02)较模型组显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

5 小肠黏膜 NF- κ B 表达(图 3,表 1) 肠黏膜 NF- κ B 阳性细胞为胞核或胞核胞浆棕褐色着色。模型组(5.75 ± 0.46)与空白组(1.38 ± 1.19)比较, NF- κ B 阳性表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),云母干预组 NF- κ B 阳性表达(0.13 ± 0.35)较模型组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠小肠黏膜 NF- κ B 表达

组别	n	NF- κ B 表达				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
空白	8	2	5	1	0	75
模型	8	0	0	6	2	100*
云母干预	8	5	2	1	0	37.5 $^{\Delta}$

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

讨 论

NSAIDs 用于抗炎、解热、镇痛已有 100 多年历史, NSAIDs 药物相关的胃肠损伤,轻者表现为黏膜充血、水肿、糜烂及一过性浅表溃疡,重者可造成多发溃疡合并消化道出血、穿孔甚至危及生命^[9]。本实验大鼠经 7.8 mg/(kg·d)双氯芬酸灌胃后,短期内出现不同程度肠道损伤,模型组大鼠小肠黏膜充血,肠壁见多发圆形或类圆形溃疡,沿肠管纵轴分布;部分肠道粘连,伴局部肠管扩张或肠腔狭窄,其中模型组死亡 2 只,濒死 3 只,均因肠道出血穿孔,腹腔感染所致,实验证实小剂量双氯芬酸口服短期内即可引起大鼠小肠损伤。

近年来临床开始重视 NSAIDs 相关小肠损伤,但国内外尚缺乏有效的防治药物。中药云母,属硅酸盐类矿物药,首载于《神农本草经》,性“甘、温”,归入脾、肺、膀胱经,具有“主身皮死肌,中风寒热,除邪气,安五脏,益子精,明目“和”下气坚肌,续绝补中,疗五劳七伤“之功效。云母为层状硅酸盐类晶体结构矿物,其主要成分为二氧化硅(SiO₂)和氧化铝(Al₂O₃),具有吸附性、膨胀性、可塑性和离子交换性等特殊的物理性质,故可吸附于黏膜表面,加强黏膜

屏障功能。钱云等^[10]采用大鼠慢性胃炎模型,观察云母的黏膜保护作用,证实云母可吸附于胃黏膜表面,促进黏液分泌、PGE₂合成,减少炎细胞浸润,逆转肠上皮化生,从而促进组织修复再生和维持胃黏膜完整性。我们对模型大鼠予云母干预,发现云母干预组大鼠小肠黏膜大体及组织学损伤评分均较模型组显著降低,提示云母对 NSAIDs 相关小肠损伤具有较好的黏膜保护作用,可有效减轻大鼠小肠损伤,这一结果为临床防治 NSAIDs 相关小肠损伤提供了实验依据。

细胞因子及炎症介质在肠道损伤中的作用受到广泛关注。NF- κ B 作为多种信号转导途径的枢纽,其激活可以调节多种炎症因子和免疫基因的表达^[11], NF- κ B 活化可促发下游炎症因子 TNF- α 、IL-6 等进一步释放,从而产生一系列炎症反应,造成组织损伤。本实验显示,在空白组中部分大鼠 NF- κ B 有弱表达,而模型组小肠上皮 NF- κ B 活性显著增加,血清 TNF- α 表达明显升高;经云母干预后,大鼠肠黏膜 NF- κ B 活性较模型组显著降低,血清 TNF- α 水平亦较模型组明显降低,提示云母除可吸附于黏膜表面,减少炎细胞浸润、加强黏膜屏障等作用外,还具有抑制炎症因子激活作用,可抑制肠上皮 NF- κ B 活化,减少 TNF- α 表达,从而下调 NF- κ B 介导的一系列炎症反应,减少炎症瀑布效应的发生,减轻肠道损伤,这可能是云母保护 NSAIDs 相关小肠损伤的机制之一。

云母干预组肠黏膜 NF- κ B 活性甚至低于空白组,推测可能与云母的黏膜吸附功能有关。云母具有天然层状结构,有较好的吸附作用,可吸附于黏膜表面,推测其除可加强黏膜屏障功能外,对炎症因子亦有吸附作用。

参 考 文 献

- [1] Cappell MS, Schein JR. Diagnosis and treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated upper gastrointestinal toxicity[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2000, 29(1):97-124.
- [2] Seager JM, Hawkey CJ. ABC of the upper gastrointestinal tract. Indigestion and non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. *BMJ*, 2001, 323(7323):1236-1239.
- [3] 王良静,陈淑洁,姒健敏.云母对实验性胃溃疡愈合质量的影响[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(19):1536-1541.
Wang LJ, Chen SJ, Si JM. Effect of muscovite on the quality of gastric ulcer healing[J]. *China J Chin Mater Med*, 2005, 30(19):1536-1541.
- [4] 王良静,陈淑洁,姒健敏.云母对大鼠溃疡性结肠炎的肠黏膜保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(23):1840-1844.
Wang LJ, Chen SJ, Si JM. Intestinal mucosa protection of muscovite on ulcerative colitis in rats[J]. *China J Chin Mater Med*, 2005, 30(23):1840-1844.
- [5] Chen Y, Chen Y, Liu WL, et al. Therapeutic effects of rectal administration of muscovite on experimental colitis in rats[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(5):912-919.
- [6] Zhu F, Qian J, Pan G. Establishment of TNBS induced experimental colitis[J]. *Acta Acad Med Sin*, 1998, 20(4):271.
- [7] Chiu CT. Intestinal mucosal lesion in lowflow states[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4):478.
- [8] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(7):931-934.
- [9] 彭南安.不同抗酸药防治非甾体类抗炎药胃粘膜损伤的疗效观察[J]. *实用药物与临床*, 2007, 10(4):212-214.
Peng NA. Therapeutic effect of different anti-acid drugs on the gastric mucosa damage induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Pract Pharm Clin Remed*, 2007, 10(4):212-214.
- [10] 钱云,姒健敏,王良静,等.云母对胃黏膜保护作用机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(8):781.
Qian Y, Si JM, Wang LJ, et al. Mechanisms of muscovite on gastric mucosal protective effect[J]. *China J Chin Mater Med*, 2004, 29(8):781.
- [11] Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takács T, et al. Role of NF- κ B activation in the pathogenesis of acute pancreatitis[J]. *Gut*, 2008, 57(2):259-267.

(收稿:2009-08-07 修回:2010-02-02)