

· 博士之窗 ·

中药清肠栓对溃疡性结肠炎大鼠结肠通透性的影响

卢璐 谢建群

摘要 目的 探讨复方中药清肠栓对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠黏膜通透性的影响及其修复结肠溃疡的作用机制。方法 采用异硫氰酸荧光素-右旋糖 4 000(FITC-dextran 4 000, FD-4)作为标记物,在体实验与离体实验相结合测定大鼠结肠通透性,观察中药清肠栓对 UC 大鼠结肠通透性的影响。结果 (1)在体动物实验:发现模型组大鼠结肠对 FD-4 的通透性较正常组显著增加,在 30 min 内增加为对照组的 6 倍。清肠栓高剂量及中剂量组能不同程度的抑制 UC 大鼠结肠通透性的升高($P < 0.05$)。(2)离体实验:通过测定 FD-4 的通透性系数(Papp)反映发现,大鼠升结肠黏膜通透性 120 min 内,模型组 FD-4 的 Papp 为 $(5.001 \pm 1.316) \times 10^{-8} \text{ cm/s}$, Papp 增加为正常组的 2.5 倍,清肠栓高剂量及中剂量组能有效降低升结肠黏膜对 FD-4 的 Papp($P < 0.05$)。结论 清肠栓能有效抑制 UC 大鼠结肠通透性的升高,改善肠黏膜屏障功能,促进溃疡愈合。

关键词 清肠栓;溃疡性结肠炎;肠道通透性

Effect of Qingchang Suppository on Intestinal Permeability in Rats with Ulcerative Colitis LU lu and XIE Jian-qun *Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Qingchang Suppository (QCS, a Chinese herbal preparation) on intestinal permeability in rat ulcerative colitis (UC) model induced by trinitrobenzene sulfonic acid, and to explore the mechanism of QCS for healing the ulceration. **Methods** Labeled by FITC-dextran 4 000 (FD-4), the permeability of colonic membrane in UC rat and effect of QCS on it were observed *in vitro* and *in vivo*. **Results** *In vivo* study showed that the colonic FD-4 permeability of UC rat was increased significantly, being 6-fold of normal in 30 min. After treated with QCS of high/moderate dosage, it significantly attenuated to different degrees ($P < 0.05$). FD-4 permeability coefficient (Papp) determination *in vitro* showed that Papp in model rats increased to $(5.001 \pm 1.316) \times 10^{-8} \text{ cm/s}$ in 120 min, being 2.5-fold of control; and which could be decreased by high/moderate dose QCS effectively ($P < 0.05$). **Conclusion** QCS could suppress the high colonic permeability in UC model rats, improve the barrier function of intestinal membrane and promote the healing of ulceration.

KEYWORDS Qingchang Suppository; ulcerative colitis; intestinal permeability

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是以腹痛、腹泻、黏液脓血便以及里急后重为主要症状,以结肠黏膜慢性炎症和溃疡形成为主要病理特点的临床常见的肠道疾病。好发于直肠、乙状结肠。因治疗难度大,疗程长,而且治愈后常易复发,已被 WHO 确认为现代难治病。近年来,有研究表明 UC 作为肠黏膜损伤性疾病,其发病与肠上皮屏障功能减弱,肠道通透性增加相关。而目前关于中药栓剂改善 UC 肠道通透性方面的实验性研究报道甚少。本实验旨在探讨复方中药

清肠栓对三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇诱导的 UC 大鼠结肠黏膜通透性的影响及其修复结肠溃疡的作用机制。

材料与方 法

1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 72 只,体重为 $(250 \pm 20) \text{ g}$,由上海中医药大学动物实验中心提供。

2 主要试剂与药品 戊巴比妥钠(西唐生物),5% 2, 4, 6 三硝基苯磺酸原液(Sigma),FITC-dextran 4 000(Sigma,3822009000),甲醛(上海生工),乙醇(上海生工),清肠栓(由马齿苋、青黛、参三七、五倍子等组成,上海秀龙中药厂生产),柳氮磺胺吡啶(SASP,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30772801)

作者单位:上海中医药大学附属龙华医院(上海 200032)

通讯作者:谢建群, Tel: 021-64385700, E-mail: xjq2326@126.com

山西三九同达药业有限公司生产), 肝素。

3 仪器设备 荧光分光光度计(日立 F4500, 日本), Powerlab/8sp 高速生物信号记录仪(埃德仪器公司, 澳大利亚), CEZ-9100 型短路电流放大器(日本光电, 日本), VCCMC-2 电压钳(生理仪器公司, 美国), P2300Ussing 型浴槽(生理仪器公司, 美国), 电子天平(塞多利斯, 德国)。

4 缓冲液的配制

4.1 配制台式液(mmol/L) NaCl 137, KCl 2.7, NaHCO₃ 12, NaH₂PO₄ 0.33, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, 葡萄糖 5.5, 加 HCl 调节 pH 至 7.4。实验前新鲜配制。

4.2 配制 PBS 液(mmol/L) NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 10, KH₂PO₄ 1.8, 加 HCl 调节 pH 至 7.4, 4 °C 保存, 实验前新鲜配制。

4.3 配制 Ringer 液(mmol/L) NaCl 107, KCl 4.5, NaHCO₃ 25, Na₂HPO₄ 1.8, NaH₂PO₄ 0.2, CaCl₂ 1.2, MgSO₄ 1.0, 葡萄糖 12。搅拌均匀后充氧(95% O₂ + 5% CO₂ 混合气)20 ~ 30 min, 至氧饱和, 加 HCl 调节 pH 至 7.4, 实验前新鲜配制。

5 动物模型的建立 实验分两批进行, 每批 36 只大鼠, 随机分为正常对照(正常)组, 模型组, SASP 组, 清肠栓高、中、低剂量组, 共 6 组, 每组 6 只。造模前全部大鼠均放在铁笼中喂养, 禁食不禁水 24 h; 除正常组 6 只大鼠以外, 其余 30 只均予造模; 大鼠先给予戊巴比妥钠, 按 45 mg/kg 腹腔麻醉。再参照文献报道^[1] TNBS 造模最佳剂量 100 mg/kg 计算, 用 1 mL 注射器抽吸 TNBS 原液(0.20 mL/100 g SD 大鼠), 继续抽吸 0.25 mL 的 50% 乙醇混合后, 用改良后的直灌胃针插入肛门上段 8 cm 后注入混合试剂。然后用金属夹夹大鼠肛门 30 min, 同时释放大鼠归笼, 让动物保持平躺自然清醒后自由饮食。3 天内, 动物出现腹泻、黏液脓血便后, 随机抽样检查, 经解剖及光镜证实结肠溃疡率 100%; 大鼠造模后第 3 天, 开始灌肠给药, 灌肠方法与造模时相同, 连续给药 7 天。清肠栓用量按人用药量的 50、25、12.5 倍给药, SASP 用药量, 按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值表^[2]计算。

6 在体大鼠结肠通透性的测定 实验前, 动物禁食过夜, 实验前先肝素化(300 u/kg, 腹腔注射), 30 min 后予戊巴比妥钠(45 mg/kg, 腹腔注射)麻醉, 颈静脉插管用于采集血样。沿腹中线切开腹腔, 结扎回肠末端, 及降结肠末端, 并结扎双侧肾蒂, 自回肠末端插管注入含有 0.4 mg/mL FITC-dextran 4 000 (FD-4) 的台氏液(25 mL/kg), 然后缝合腹部。在注入 FD-4 后 0、15、30、60、90、120 min 取血样 100 μL, 用 PBS 稀释

100 倍, 荧光法测定血样中 FD-4 含量。结肠黏膜通透性用由肠腔进入血液的 FD-4 量表示^[3]。

7 离体大鼠升结肠通透性的测定

7.1 电极的制作 (1) Ag/AgCl 电极制备: 将光洁银丝置于电镀池(介质: 0.9% NaCl 溶液)阳极, 1.5 V、30 ~ 40 μA 电镀 4 ~ 6 h, 至表面均匀覆盖一层致密 AgCl 颗粒, 蒸馏水冲洗后晾干备用。(2) 盐桥的制作: 首先配制含 3 mmol/L KCl 的 3% 琼脂混悬液 30 mL, 加热煮沸, 待稍冷却后将凝胶灌注于电极塑料管尖端, 高度约 1.5 cm, 然后塑料管内注满 3 M KCl 溶液。注意电极内勿产生气泡, 否则弃用。(3) 将制作好的 Ag/AgCl 电极与含有琼脂盐桥的塑料管连接, 从而制成记录电极和参比电极。

7.2 大鼠结肠黏膜分离方法 由于 UC 发病多累及远端结肠, 造成黏膜充血溃疡, 多数溃疡深达肌层, 故本实验选取升结肠测定通透性。动物造模结束后, 麻醉并打开腹腔, 从回盲交点处向下开始取长约 2 cm 的升结肠一段, 置入 4 °C Ringer 液中, 去除脂肪结缔组织并沿肠系膜纵形剪开, 洗净肠内容物, 用大头针将黏膜层朝下固定于蜡盘上, 持续充氧(95% O₂ + 5% CO₂ 混合气)。然后, 用精细镊将肌层剥除(小心勿损伤粘膜), 再把黏膜剪成面积约 1.0 cm × 0.8 cm 的膜片, 固定在 Ussing 型浴槽中(黏膜暴露面积 0.5 cm²), 黏膜顶侧面朝左, 基侧面朝右。

7.3 升结肠黏膜通透性测定 黏膜上皮在 Ussing 型灌流槽中平衡 30 min, 向黏膜顶侧面加入 0.1 mg/mL 的 FD-4, 在加入 FD-4 后的 0、15、30、60、90、120 min, 从基侧面抽取 200 μL Ringer 液, 通过荧光法测定其中 FD-4 含量^[4]。结肠上皮黏膜通透性由 FD-4 的通透性系数(Papp)表示, $Papp = dQ/dt/AC$, 在此, dQ/dt 为 FD-4 转运通过上皮单层速率, A 是整个上皮的面积, C 是左腔内 FD-4 的初始浓度。

8 结肠一般形态学观察 动物造模结束后, 取一段结肠用 10% 甲醛固定后, 石蜡包埋, 切成 4 μm 的切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 光学显微镜下观察结肠组织形态学变化。

9 统计学方法 应用 Graphpad Prism 5.0 进行统计学分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间比较用 Student's t-检验, 多组数据间比较用 One-way ANOVA 检验。

结 果

1 各组在体大鼠结肠通透性比较(表 1) 动物给药后, 用 FD-4 作为标记物在体测定大鼠结肠通透

表 1 各组在体大鼠结肠通透性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FD-4 ($\mu\text{g/L}$)					
		0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
正常	6	0.032 ± 0.024	0.056 ± 0.035	0.098 ± 0.046	0.137 ± 0.032	0.158 ± 0.051	0.127 ± 0.075
模型	6	0.036 ± 0.019	0.219 ± 0.178	0.652 ± 0.175	0.757 ± 0.143	0.822 ± 0.224	0.726 ± 0.167
SASP	6	0.023 ± 0.014	0.114 ± 0.048	0.196 ± 0.070	0.269 ± 0.102	0.307 ± 0.091	0.261 ± 0.097
清肠栓高剂量	6	0.018 ± 0.008	0.081 ± 0.033	0.268 ± 0.092	0.434 ± 0.103	0.487 ± 0.100	0.420 ± 0.102
清肠栓中剂量	6	0.025 ± 0.018	0.106 ± 0.047	0.317 ± 0.068	0.463 ± 0.107	0.578 ± 0.094	0.475 ± 0.083
清肠栓低剂量	6	0.026 ± 0.016	0.153 ± 0.066	0.471 ± 0.139	0.631 ± 0.125	0.688 ± 0.109	0.621 ± 0.098

性。模型组大鼠结肠对 FD-4 的通透性较正常组有显著增加,在 30 min 内增加为对照组的 6 倍。SASP 组和清肠栓组能不同程度的抑制 UC 大鼠结肠通透性。

2 各组离体大鼠升结肠通透性比较(表 2) 动物给药后,分离出升结肠黏膜固定于 Ussing 型灌流槽中,用 FD-4 作为标记物,通过测定 FD-4 的 Papp 反映升结肠黏膜通透性的变化。120 min 内模型组 FD-4 的 Papp 为 $(5.001 \pm 1.316) \times 10^{-8} \text{ cm/s}$,较正常组显著增加,Papp 增加为正常组的 2.5 倍,SASP 和清肠栓能有效降低升结肠黏膜对 FD-4 的 Papp ($P < 0.05$)。

表 2 各组离体大鼠升结肠通透性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Papp ($\times 10^{-8} \text{ cm/s}$)
正常	6	1.995 ± 0.395
模型	6	5.001 ± 1.316*
SASP	6	2.513 ± 0.435 Δ
清肠栓高剂量	6	3.555 ± 0.546
清肠栓中剂量	6	3.568 ± 0.551 Δ
清肠栓低剂量	6	4.284 ± 0.521

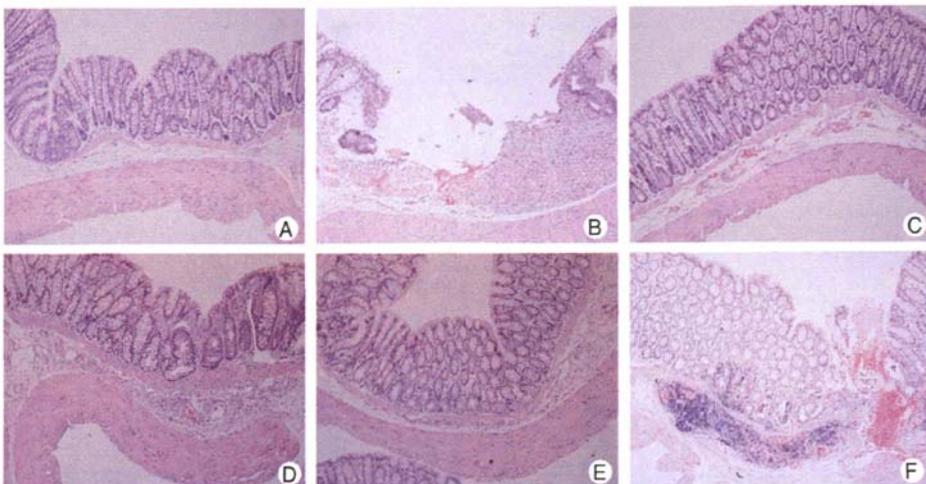
注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 结肠组织病理学变化 正常组结肠组织未出现异常(图 1A)。TNBS/乙醇模型造模引起了结肠组

织灶性坏死,溃疡形成,部分深达肌层,大量炎细胞浸润,溃疡边缘腺上皮细胞增生(图 1B)。给予 SASP 治疗后,大部分标本仅见结肠壁黏膜下层轻度充血、水肿(图 1C)。清肠栓高剂量组治疗后,结肠壁黏膜下层显著充血、水肿、炎细胞浸润。腺上皮细胞增生,部分腺体扩张呈囊状(图 1D)。清肠栓中剂量组治疗后,大部分标本仅见结肠壁黏膜下层轻度充血、水肿(图 1E)。清肠栓低剂量组治疗后,结肠壁黏膜层充血、出血,大量炎细胞浸润,小溃疡形成(图 1F)。

讨 论

UC 的发病机制尚未完全明确,主要与遗传、环境、自身免疫、感染等有关。近年研究发现,肠黏膜屏障功能异常在 UC 发病机制中发挥重要的作用。肠道感染、炎症等因素能诱导肠黏膜屏障功能异常,使黏膜通透性增高,导致肠腔内细菌、抗原等物质移位至黏膜固有层而激活免疫细胞,诱导黏膜异常免疫反应的发生^[5]。UC 发病时,一些损伤性因素如炎症细胞因子能破坏肠黏膜屏障,加重黏膜免疫异常反应的发生。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 SASP 组;D 为清肠栓高剂量组;E 为清肠栓中剂量组;F 为清肠栓低剂量组

图 1 各组结肠组织病理学变化 (HE $\times 100$)

目前普遍认为,肠黏膜屏障功能异常是 UC 发病的分子基础,UC 发病时肠黏膜屏障功能异常,肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层移位,进一步激活固有层免疫细胞,导致肠黏膜异常炎症反应^[6,7]。

肠道屏障功能是指肠道上皮具有分隔肠腔内物质,防止致病性抗原侵入的功能。肠黏膜屏障包括机械性屏障、免疫性屏障和菌群屏障。其中又以机械屏障最为重要,其结构基础为完整的肠黏膜上皮细胞以及上皮细胞间的紧密连接。本实验采用的 TNBs/乙醇造模法属于正常免疫系统下的半抗原诱导性模型,当 TNBs/乙醇灌肠时,乙醇作为有机溶剂溶解肠黏膜表面的黏液,暂时性破坏肠黏膜屏障,使 TNBs 与肠组织蛋白结合形成完全抗原,导致肠黏膜免疫系统针对该抗原的迟发性变态反应,并造成肠黏膜的损伤。同时给予不同剂量的中药清肠栓后,结肠黏膜的损伤程度有不同程度的减轻。

本研究选用 FD-4 作为标记物,采用在体动物实验与离体动物实验相结合,考察了中药清肠栓对大鼠结肠通透性的影响。FD-4 是一种分子量为 4 000,分子半径为 1.4 nm 的大分子物质,常被用在不同的动物模型中检测肠道通透性^[3,4,8,9]。在体测定结肠通透性可以直接地反映整段结肠对标记物的通透性,但是局限性在于测定过程会受到麻醉、血压、呼吸变化的影响;离体测定升结肠黏膜通透性可以避免上述因素的影响,实验条件较易控制。研究表明,TNBs/乙醇模型可引起大鼠结肠通透性的显著增加,反映为血液中 FD-4 含量的升高和升结肠黏膜上皮对 FD-4 Papp 的增加。给予不同剂量的清肠栓灌肠后,大鼠结肠通透性的增加得到了明显的抑制。说明清肠栓不仅能抑制肠黏膜炎症反应,还能有效地调节肠黏膜屏障功能,改善肠黏膜屏障功能。

参 考 文 献

[1] 王皓, 欧阳钦, 胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立[J]. 胃肠病学, 2001, 6(1):7-10.

Wang H, Ouyang Q, Hu RW. The establishment of the animal model of colitis induced by TNBS[J]. *Gastroenterology*, 2001, 6(1):7-10.

[2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002:1860-1861.

Xu SY, Bian RL, Cheng X, editors. *Experimental methodology on pharmacology* [M]. Beijing: People' Medical Publishing House, 2002:1860-1861.

[3] Xiao DT, Hong C, Xiao WQ, et al. Platelet-activating factor increases mucosal permeability in rat intestine via tyrosine phosphorylation of E-cadherin [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 129(7): 1522-1529.

[4] Fan Y, Wu DZ, Gong YQ, et al. Effects of calycosin on the impairment of barrier function induced by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003; 481(1):33-40.

[5] Lewis K, Caldwell J, Phan V, et al. Decreased epithelial barrier function evoked by exposure to metabolic stress and nonpathogenic E. Coli is enhanced by TNF-alpha[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(2): G669-G678.

[6] Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, et al. Proinflammatory cytokins disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms[J]. *J Immunol*, 2003, 171(9): 6164-6172.

[7] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2007, 448(1): 427-434.

[8] Ferrier L, Berard F, Debrauwer L, et al. Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol*, 2006, 168(4):1148-1154.

[9] Wang Q, Fang CH, Hasselgren PO. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice [J]. *Am J Physiol Regulat Integr Comp Physiol*, 2001, 281(3): R1013-R1023.

(收稿:2010-04-14 修回:2010-07-15)