

四逆散对溃疡性结肠炎大鼠血清 白介素-6 和白介素-13 的影响

卢健, 王凌志, 范颖*, 林庶茹
(辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:探讨四逆散对实验性溃疡性结肠炎(UC)大鼠白介素(IL)-6 和 IL-13 的影响,以及君臣配伍在组方中的作用。方法:SD 大鼠 50 只,分为 5 组,即正常组、模型组、四逆散组、柴芍枳组和柴芍组;采用免疫法造模,用家兔新鲜结肠黏膜制备抗原乳化液,分别于造模第 1, 10, 17, 24 天注射于大鼠的双侧足跖、腹股沟及背部,造模第 2 天分组 ig,正常组与模型组按照 10 mL·kg⁻¹蒸馏水 ig;四逆散组按照 1.75 g·kg⁻¹四逆散溶液 ig;柴芍枳组按照 1.31 g·kg⁻¹ ig;柴芍组按照 0.88 g·kg⁻¹ ig;第 29 天 ig 后,取材,处死大鼠;采用双抗体夹心 ELISA 法检测大鼠血清 IL-6 和 IL-13 水平。结果:模型组大鼠血清 IL-6 (163.64 ± 22.17) μg·L⁻¹明显高于正常组(59.80 ± 11.72) μg·L⁻¹, (P < 0.05), IL-13 (78.64 ± 12.66) μg·L⁻¹显著低于正常组(616.00 ± 133.80) μg·L⁻¹, (P < 0.05);与模型组比较,四逆散能显著降低大鼠血清 IL-6 含量(73.00 ± 9.92) μg·L⁻¹, 明显增加 IL-13 含量(264.89 ± 128.05) μg·L⁻¹ (P < 0.05);去掉甘草的柴芍枳配伍只降低大鼠血清 IL-6 含量(131.75 ± 31.93) μg·L⁻¹ (P < 0.05),对 IL-13 含量无明显影响;而柴芍配伍对 IL-6, IL-13 含量无明显影响。结论:四逆散干预实验性 UC 的机制与调控细胞因子网络平衡有关,对实验性 UC 大鼠血清 IL-6, IL-13 的影响以四逆散全方作用最佳,而方中柴芍的君臣配伍并未发挥主要作用。

[关键词] 四逆散; 白介素-6; 白介素-13; 溃疡性结肠炎;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0233-03

Influence of Sini Powder on IL-6 and IL-13 in Experimental Ulcerative Colitis Rats

LU Jian, WANG Lin-zhi, FAN Ying*, LIN Shu-ru

(Prescription Subject of Liaoning Traditional Chinese Medicine University, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To study influence of Sini powder on interleukin (IL)-6 and IL-13 in experimental ulcerative colitis (UC) rats. **Method:** Rats were divided into 5 groups, including the normal group, model group, Sini powder group, Chaishaozhi group and Chaishao group. The model was made with immunization that fresh rabbit colonic mucosa were made into antigen emulsion, and injected into the rat's bilateral paws, groins and backs in 1st, 10th, 17th, 24th day after modeling. Meanwhile, corresponding drugs were ig given from the 2nd day after modeling. The normal group and model group were gavaged with 10 mL·kg⁻¹ distilled water; and Sini powder powder group with 1.75 g·kg⁻¹ Sini powder solution; and Chaishaozhi group with Chaishaozhi 1.31 g·kg⁻¹ Chaishaozhi solution; and Chaishao group with 0.88 g·kg⁻¹ Chaishao solution. On the 29th day, we sacrificed the rats and drawn. Through detecting IL-6 and IL-13 levels of rat's colon mucosal tissue and serum with ELISA. **Result:** IL-6 levels of model group (163.64 ± 22.17) μg·L⁻¹ higher than normal group (59.80 ± 11.72) μg·L⁻¹, P < 0.05, and IL-13 levels (78.64 ± 12.66) μg·L⁻¹ lower than normal (616.00 ± 133.80) μg·L⁻¹, P < 0.05. After feeding experimental herbal medicine, Sini powder can significantly reduce experimental

[收稿日期] 20120405(008)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2006T094)

[第一作者] 卢健, 博士, 副教授, 从事方剂效用机理研究, Tel:024-31207085, E-mail:juioo@sina.com

[通讯作者] * 范颖, 教授, 博士生导师, 从事方剂学研究, Tel:024-31207104

rat' s IL-6 levels (73.00 ± 9.92) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$) increased IL-13 levels (264.89 ± 128.05) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). After removing licorice, Chaishaozhi compatibility could only reduce the level of IL-6 (131.75 ± 31.93) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$) with no increased level of IL-13. While the compatibility of Chaishao could not only reduce the levels of IL-6, but reduce IL-13 content. **Conclusion:** The mechanism of Sini powder intervening experimental UC is related to the balance of cytokine network. The function of Sini power lies in influencing IL-6, IL-13, but the compatibility of Chaishao did not play a major role.

[**Key words**] Sini powder; IL-6; IL-13; ulcerative colitis

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 以腹泻、黏液脓血便、里急后重为主要临床表现,其病因及发病机制目前尚不明确,大多数医家认为与遗传、免疫、环境因素等密切相关。大量的临床与实验研究也表明,细胞因子网络平衡失调是导致 UC 发病的重要因素^[1]。本课题组通过前期对四逆散不同配伍干预实验性 UC 的效用研究,拆方分析四逆散不同配伍干预实验性 UC 的效用,结果发现四逆散能够干预实验性 UC,以四逆散全方、柴枳芍配伍与柴芍配伍作用最为理想^[2]。本实验在此基础上,进一步探讨四逆散对实验性 UC 大鼠白介素 (IL)-6 和 IL-13 的影响,以期探究四逆散干预 UC 的作用机制。

1 材料

1.1 受试药物 四逆散由柴胡、芍药、枳实、甘草以 1:1:1:1 比例组成。柴胡免煎颗粒 (0909165)、芍药免煎颗粒 (0909053)、枳实免煎颗粒 (0909086)、甘草免煎颗粒 (0909050) 均购自江苏省江阴天江药业有限公司。

1.2 动物 健康 SD 大鼠, SPF 级, 50 只, 雌雄各半, 体重 160 ~ 190 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 许可证号 SCXK(沪)2008-0016。

1.3 试剂 蛋白标准液、考马斯亮蓝溶液 (批号 20090825, 均购自南京建成生物工程公司), 完全福氏佐剂 (批号 096K89031, 美国 Sigma 公司), 大鼠 IL-6 (批号 1005094)、IL-13 (批号 1005132) 检测试剂盒 (均购自北京邦定生物医学公司)。

1.4 仪器与设备 550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), TDL-5-A 型离心机 (上海安亭科学仪器厂), WS2-261-79 型电热恒温水浴箱 (北京长安科学仪器厂), DY89-II 型电动玻璃匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 根据实验结果, 将实验动物分为 5 组: 正常组、模型组、四逆散组、柴枳枳组和柴芍组, 每组 10 只, 各组体重统计学比较无显著差异。

2.2 造模与给药 采用免疫法造模^[3]。刮取家兔新鲜结肠黏膜制成组织匀浆, 将其以 $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度离心 30 min, 取上清液提纯, 用 Lowry 法测定蛋白质含量, 冷藏备用。使用时与等量完全福氏佐剂充分混匀, 制成抗原乳化液。于造模第 1 天注射抗原乳化液, 分别注射于大鼠的双侧足跖、腹股沟及背部, 每只 0.5 mL; 第 10, 17, 24 天依同法注射。按 $10\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分别配制 ig 药物, 于造模第 2 天开始分组 ig。正常组与模型组按照 $10\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 蒸馏水 ig; 四逆散组按照 $1.75\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 四逆散溶液 ig; 柴枳枳组: 按照 $1.31\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig; 柴芍组按照 $0.88\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig。于第 29 天 ig 后, 称重, 麻醉后于腹主动脉取血, 待侧指标; 然后全部处死, 剖取结肠, 自肛门上约 2 ~ 8 cm 处, 剖开、展平, 肉眼观察黏膜, 剩余部分结肠组织以多聚甲醛固定, 做病理切片, HE 染色, 镜下观察。参考结肠病理组织学评分标准^[4], 分析实验大鼠的结肠组织损伤情况 (见表 1)。

表 1 结肠病理组织学评分标准

| 分数 | 结肠病理切片病变程度 | | |
|----|-------------|------|---------|
| | 溃疡 | 炎症 | 损害深度 |
| 0 | 没有溃疡 | 没有炎症 | 没有损害 |
| 1 | 溃疡长度 < 3 mm | 轻度炎症 | 损害至黏膜下层 |
| 2 | 溃疡长度 > 3 mm | 中等炎症 | 损害至肌层 |
| 3 | | 严重炎症 | 损害至浆膜层 |
| 8 | | | 最大可能分数 |

2.3 指标检测 采用双抗体夹心 ELISA 法测定, 严格按试剂盒要求操作。从冰箱取出大鼠血清; 取出酶标板, 依照次序对应分别加 100 μL 的对照品于空白微孔中; 分别标记样品编号, 加 100 μL 样品于空白微孔中; 在对照品孔和样品孔中加 50 μL 的酶标记溶液; $36.2\ ^\circ\text{C}$ 孵育反应 60 min; 手工洗板 6 次, 每次静置 25 s; 每孔加底物 A、B 液各 50 μL ; $36.2\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育反应 15 min; 每孔加 50 μL 终止液, 终止反应 6 min; 放入酶标仪中检测, 采集数据。

2.4 统计处理 采用统计软件 SPSS 10.0 处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用单因素方差

分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 结肠组织病理学及其评分 模型组大鼠病变结肠黏膜表面可见溃疡,个别深达肌层,炎症反应较重,有充血、糜烂,中性粒细胞浸润,黏膜上皮部分缺失,局部固有层腺体减少,黏膜下层血管增生,黏膜肌层不明显。其余各组均有不同程度的病变。结肠组织病理学评分结果见表 2。

3.2 对实验性溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-6 的影响 与正常组比较,模型组、四逆散组、柴芍枳组和

柴芍组实验大鼠血清 IL-6 的含量均明显高于正常组 ($P < 0.05$);与模型组比较,四逆散组和柴芍枳组显著降低 ($P < 0.05$);与四逆散组比较,柴芍枳组和柴芍组均显著高于四逆散组;柴芍枳组和柴芍组之间比较,柴芍枳组明显高于柴芍组。见表 2。

3.3 对实验性 UC 大鼠血清 IL-13 的影响 与正常组比较,模型组、四逆散组、柴芍枳组和柴芍组实验大鼠血清 IL-13 的含量均明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,四逆散组显著增加 IL-13 的含量,柴芍枳组、柴芍组与模型组比较无显著性差异。见表 2。

表 2 四逆散对实验性 UC 大鼠结肠组织病理学评分,血清 IL-6 和 IL-13 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | 结肠病理组织学评分 | IL-6/ $\mu g \cdot L^{-1}$ | IL-13/ $\mu g \cdot L^{-1}$ |
|-----|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 正常 | - | 0.40 ± 0.52 | 59.80 ± 11.72 | 616.00 ± 133.80 |
| 模型 | - | 4.40 ± 1.07 ¹⁾ | 163.64 ± 22.17 ¹⁾ | 78.64 ± 12.66 ¹⁾ |
| 四逆散 | 1.75 | 2.80 ± 0.79 ^{1,2)} | 73.00 ± 9.92 ²⁾ | 264.89 ± 128.05 ^{1,2)} |
| 柴芍枳 | 1.31 | 3.20 ± 0.79 ^{1,2)} | 131.75 ± 31.93 ^{1,2,3)} | 141.07 ± 40.11 ^{1,3)} |
| 柴芍 | 0.88 | 3.20 ± 0.79 ^{1,2)} | 165.95 ± 26.88 ^{1,3)} | 160.39 ± 69.39 ^{1,3)} |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与四逆散组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

尽管 UC 的发病机制尚不明确,但大量研究证实细胞因子的异常表达是 UC 发病的重要因素。IL-6 为促炎因子,由单核巨噬细胞、T 细胞等多种细胞产生,能够促进 B 细胞增殖、分化,增强细胞和体液免疫介导的组织损伤,趋化中性粒细胞等炎性细胞进入肠道病变部位,引起肠道炎症和组织破坏。研究表明,UC 患者肠黏膜组织和血清中 IL-6 水平均显著升高^[5]。IL-13 为抗炎因子,主要由活化的 T 细胞产生,能调节单核巨噬细胞和 B 细胞功能,下调单核细胞功能,抑制促炎因子的分泌。有研究表明,UC 患者的 IL-13 在肠黏膜的表达明显下降^[6],血清 IL-13 水平与疾病严重程度显著相关^[7]。

本实验结果表明,四逆散能显著降低实验大鼠血清 IL-6 含量 ($P < 0.05$),明显增加 IL-13 含量 ($P < 0.05$);去掉甘草的柴芍枳配伍只能降低实验大鼠血清 IL-6 含量 ($P < 0.05$),不能使 IL-13 含量增加;而柴芍配伍不仅不能降低 IL-6 水平,反而增加其含量,同时也不能降低 IL-13 含量。由此推测,四逆散干预实验性 UC 的机制与调控细胞因子网络平衡有关,对实验性 UC 大鼠血清 IL-6、IL-13 的影响以四逆散全方作用最佳,而方中柴芍的君臣配伍并未发挥主要作用。这与本课题组前期所完成的四逆散对其他细胞因子^[8]的作用结果不同,有待于进一步考察四逆散方中枳实、甘草的作用。

[参考文献]

- [1] Goral V, Celenk T, Kaplan A, et al. Plasma cytokine levels in ulcerative colitis [J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(76):1130.
- [2] 卢健,范颖,马骥,等. 四逆散及不同配伍干预溃疡性结肠炎的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16):109.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版,北京:人民卫生出版社,2002:1335.
- [4] Tjandra K, Le T, Swain M G. Experimental colitis attenuates development of toxin-induced cholangitis in rats [J]. Dig Dis Sci, 2002, 47:1216.
- [5] 厉洁,曲海霞,卫红军,等. 溃疡性结肠炎患者炎症黏膜中 IL-6、IL-23 的表达及其临床意义 [J]. 胃肠病学, 2011, 16(3):42.
- [6] 庞艳华,郑长青,王轶淳,等. IL-4 和 IL-13 在溃疡性结肠炎中的表达 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2005, 14(4):410.
- [7] 张晓博,杨宪武,党惠娇,等. IL-1 β 、IL-13、TNF- α 在溃疡性结肠炎患者血清中的表达 [J]. 河北医药, 2009, 31(24):55.
- [8] 卢健,范颖,马骥,等. 四逆散对实验性溃疡性结肠炎细胞因子 mRNA 表达的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(8):83.

[责任编辑 聂淑琴]