

清肠栓对大鼠溃疡性结肠炎血清白介素-1 β 影响的研究*

★ 张涛 指导:谢建群 (上海中医药大学附属龙华医院 2004 级博士研究生 上海 201203)

摘要:目的:探讨白细胞介素-1 β (IL-1 β)在溃疡性结肠炎(UC)中的作用,进一步研究清肠栓治疗 UC 的作用机理。方法:SD 大鼠 56 只随机分为正常组、模型组(空白组)、西药组(SASP 组)、中药组(清肠栓组)共 4 组,每组 14 只。用 TNBs 100 mg·kg⁻¹灌肠建立大鼠溃疡性结肠炎模型,第 3 天开始,除正常组外,各组分别给予生理盐水、柳氮磺胺吡啶、清肠栓处理,至 7 天后处死动物。腹主动脉取血制备血清,采用 ELISA 法测定各组血清 IL-1 β 的含量。结果:UC 大鼠血清 IL-1 β 含量显著升高,西药组及中药组均能降低其含量。中药组与西药组相比, $P < 0.01$ 。结论:中药清肠栓可以通过降低血清 IL-1 β 含量,调节肠道免疫,达到缓解 UC 的治疗目的。

关键词:溃疡性结肠炎大鼠;白介素 1 β ;清肠栓

中图分类号:R 289.5 **文献标识码:**A

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎,是一种原因不明的慢性直肠和结肠炎性疾病。病变主要位于结肠的粘膜层,以溃疡为主,多累及直肠和远端结肠,也可遍及整个结肠。许多学者研究^[1]认为 UC 的基本病理机制是,在基因易患性和环境因素的作用下,加上 T 细胞不恰当的活化,从而导致肠道粘膜炎症-免疫失衡,进而发病。同时,UC 中的组织损害是过度免疫反应中,复杂的调节机制和效应机制的综合结果。白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)作为重要的细胞因子,在溃疡性结肠炎的发病中占据了重要的地位。本课题正是从清肠栓对 IL-1 β 的调节作用角度,来探讨它治疗 UC 的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级雄性 SD 大鼠 56 只,体重为(200 $\pm$ 20)g,由上海中医药大学动物实验中心提供。5%2,4,6-三硝基苯磺酸(Trinitrobenzene sulphonic acid, TNBs),购自 Sigma 公司。无水乙醇购自上海国药集团。清肠栓、柳氮磺胺吡啶购自上海中医药大学附属龙华医院药房。

1.2 动物分组与模型制备 动物称重后,随机分为四组,其中正常组 14 例,模型组 14 例,西药组 14 例,中药组 14 例。除正常组外,其余 42 只 SD 大鼠先给予 25%乌拉坦,按 0.35 mL/100g 腹腔麻醉。再参照文献报道^[2]TNBs 造模最佳剂量 100 mg/kg 计算,用 1 mL 注射器抽吸 TNBs 原液(0.18 mL/100mgSD 大鼠),继续抽吸 0.25 mL 的 50%乙醇混合后,用聚丙烯管插入肛门上段 8 cm 后注入混合试剂。6 小时后观察造模动物,约 75%大鼠出现稀便和血便。3 天后,随机处死 3 只动物,肉眼可见距肛门约 7~8 cm 处肉眼可见大小约 0.3 cm $\times$ 0.2 cm 的溃疡面,并作光镜检测说明造模成功(见图 1~图 3)。模型组给予 0.33 mL 生理盐水灌肠,西药组予柳氮磺胺吡啶 10 mg/100g 灌肠,中药组予清肠栓 160 mg/

100g 灌肠。用药 7 天。各组治疗结束后处死动物。腹主动脉取血 6~8 mL,放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

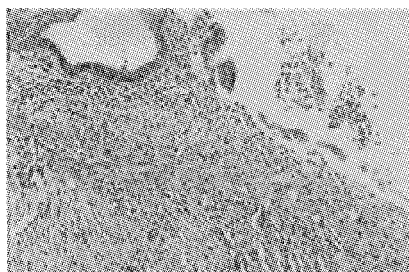
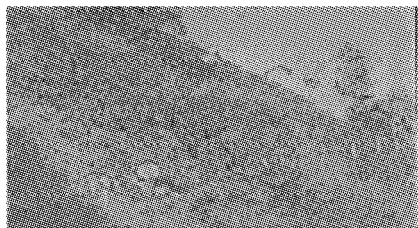


图 1 结肠粘膜面见一较大溃疡,溃疡表 图 2 结肠粘膜面见一巨大溃疡,表面充满面有渗出坏死层,可见少量幼稚肉芽组织,渗出及坏死组织,溃疡未累及粘膜肌层,粘溃疡周围的腺体扩张,腺上皮细胞轻度增 膜下层显著充血,水肿,大量炎性细胞浸润生。肠壁各层充满浸润的炎细胞($\times 200$)($\times 100$)

图 3 结肠粘膜面见一巨大溃疡,溃疡深及粘膜下层,表面充满渗出物和坏死组织,底部可见增生的肉芽组织,肌层



无明显改变($\times 100$)

1.3 标本制备 自然凝固 2 小时后,从 4℃ 冰箱中取出装置于试管中的腹主动脉血, 3000 r/min, 离心 15 分钟,分离制备血清,再用移液器将分离出的血清,用 0.5 mL dorf 管分装,放置 -20℃ 冰箱保存备检测用。

1.4 IL-1 β 的检测 各组随机挑选 6 个标本检测血清中 IL-1 β (编号 EK0393,武汉博士德生物工程有限公司)浓度,本实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。测定步骤按试剂盒说明的要求进行。工作原理:用抗大鼠 IL-1 β 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 IL-1 β 与单抗结合,加入生物素化的抗大鼠 IL-1 β ,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素与生物素结合,加入酶底物 OPD,出现黄色,加终止液硫酸,颜色变深,ELISA 读数仪在 492 nm 处测 OD 值,根据标准曲线计算标本中 IL-1 β 浓度。

1.5 统计分析 计量资料采用单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异, $P < 0.01$ 为统计学上有极显著性差异。

2 结果

组别	IL-1 β /pg·mL ⁻¹
正常组	25.63 $\pm$ 4.83 **
模型组	82.97 $\pm$ 2.23
西药组	35.18 $\pm$ 1.92 **
中药组	18.99 $\pm$ 2.07 * ** #

注:与模型组相比, ** $P < 0.01$;西药组相比, # $P < 0.01$ 。

3 讨论

大量的研究表明^[3],由淋巴细胞介导的细胞毒作用在 UC 发病机理中的作用占有重要地位。UC 患者淋巴细胞凋亡延迟,肠道免疫调节功能异常,不能将免疫反应下调,使得肠道炎症反应得以持续。由于肠粘膜通透性增加,肠腔内大量抗原摄入并反复刺激使得肠免疫系统过度反应和错误识别,激活巨噬细胞和淋巴细胞,一系列的细胞因子和炎性介质激活释放,导致机体细胞和体液免疫反应。这个免疫过程一旦启动,则该免疫反应就会级联放大,造成组织损伤。促炎因子^[4]与抗炎因子的失衡被视为 UC 发病的一个重要机制。

本次实验研究发现,模型组血清 IL-1 β 含量上升。治疗 7 天后随着症状的改善,无论西药组或是中药组,其血清 IL-1 β 水平皆呈下降趋势,与模型组相比($P < 0.01$)。这说明 IL-1 β 是具有促炎作用的重要细胞因子,并且与组织损害程度呈正相关。^[5]与文献报道一致。IL-1 β 由 153 个氨基酸残基组成,分子量为 17.5 KDa。主要由巨噬细胞产生,但几乎所有有核细胞如 B、NK、内皮细胞等,在受到外界抗原刺激

后均可合成与分泌 IL-1 β 。IL-1 β 在 UC 中的发病作用有 4 个方面:①Haruta^[6]等认为:溃疡性结肠炎结肠粘膜固有层中活化的巨噬细胞可释放 IL-1 β ,激活树突样细胞,吞噬、消化外来抗原,释放抗原片段并呈递至 T 淋巴细胞发生免疫反应。②IL-1 β ^[7]能增加由巨噬细胞所产生的细胞因子如 IL-6, TNF- α 和 IL-8,使得中性粒细胞向炎症部位募集,进入肠道病变部位,从而引起一系列的肠道病变,如结肠上皮的损伤、小血管炎、隐窝脓肿等,最终造成 UC 的发病。③IL-1 β ^[8]和 IL-1 受体的失衡是 UC 发生的重要环节。④IL-1 β ^[9]可以通过诱导释放 H₂O₂,影响 Ca²⁺ 的释放和 NK-A 的信号转导途径的开关,从而导致 UC 患者的结肠平滑肌收缩功能紊乱。显然,IL-1 β 是一种具有多种生物活性并能作用于体内多种组织和器官的细胞因子,它在炎症-免疫反应中起重要作用,故被公认为介导 UC 发病的促炎性细胞因子之一。

中药复方清肠栓由马齿苋、青黛、参三七、五倍子等组成,方中马齿苋合青黛清热解毒;参三七活血祛瘀;五倍子收湿敛疮,助青黛、三七等生肌之力。全方用药精炼,具清热利湿解毒、活血祛瘀生肌作用,对左半结肠以下溃疡,尤其是溃疡性结肠炎等急性发作有良好的治疗功效。通过本次实验结果,我们认为中药清肠栓可能通过下调促炎性细胞因子 IL-1 β ,调节肠道免疫,达到缓解 UC 的目的,可能为溃疡性结肠炎的临床治疗开辟新的途径。

参考文献

- [1]Joshua R. Korzenik, MD. Past and Current Theories of Etiology of IBD[J]. J Clin Gastroenterol, 2005, 39: S59~S65
- [2]Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten~induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96(3): 75~803
- [3]余保平,王伟岸. 主编. 消化系统病免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2000. 189~190
- [4]Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis [J]. Gastroenterology, 1998, 115: 182~205
- [5]贾百灵,候晓华. 溃疡性结肠炎患者血清白细胞介素~13 检测 [J]. 郑州大学学报(医学版). 2004, 39(2): 306~309
- [6]Haruta J, Kusugami K, Kuroiwa A, et al. Phenotypic and functional analysis of lamina propria mononuclear cells from colonoscopic biopsy specimens in patients with ulcerative colitis[J]. Am Gastroenterology, 1992, 87(4): 448
- [7]Dirk Raddatz, Miriam Bockemuhl, Giuliano Ramadori. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease. [J] European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2005, 17: 547~557
- [8]Nemetz A, Kope A, Molnar T, et al. Significant differences in the interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in a Hungarian population with inflammatory bowel disease [J]. Scand J Gastroenterol, 1999, 34(2): 175~179
- [9]Cao W, Vrees MD, Potenti FM, et al. Interleukin 1beta~induced production of H₂O₂ contributes to reduced sigmoid colonic circular smooth muscle contractility in ulcerative colitis[J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 2004, 311(1): 60~70

(收稿日期: 2005-11-28)