

美洲大蠊提取物 Ento-A 对湿热型溃疡性结肠炎模型大鼠的改善作用研究^Δ

张晶娜^{1*}, 陶磊¹, 张俊¹, 王木岭¹, 陈莹², 刘衡¹, 张成桂¹, 何苗^{1#} (1.大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室/药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心/中国西南药用昆虫及蛛形类资源开发利用协同创新中心, 云南大理 671000; 2.大理白族自治州人民医院病理科, 云南大理 671000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)01-0035-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.01.07

摘要 目的:研究美洲大蠊提取物 Ento-A 对湿热型溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠的改善作用。方法:将70只大鼠随机分为正常对照组($n=8$)和造模组($n=62$),造模组大鼠采用高糖高脂、辛辣饮食联合2,4,6-三硝基苯磺酸灌肠法复制湿热型UC动物模型。将造模成功的48只大鼠随机分为模型对照组、美沙拉嗪组(300 mg/kg)、肠炎宁(300 mg/kg)和 Ento-A 低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg,以提取物计),每组8只。正常对照组和模型对照组大鼠灌胃生理盐水,其余各组大鼠灌胃相应药物,每天1次,连续给药14 d。末次给药后,对大鼠疾病活动指数(DAI)、结肠黏膜损伤指数(CMDI)及病理组织学(HS)进行评分,测定大鼠脾指数、肝指数和结肠指数,并采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中白细胞介素8(IL-8)、IL-17、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平和结肠组织中IL-2、前列腺素E₂(PGE₂)、髓过氧化物酶(MPO)水平。结果:与正常对照组比较,模型对照组大鼠DAI评分、CMDI评分、HS评分、结肠指数以及血清中IL-8、IL-17、MDA水平和结肠组织中MPO、PGE₂水平显著升高($P<0.01$),血清中SOD水平和结肠组织中IL-2水平显著降低($P<0.01$)。与模型对照组比较,Ento-A高剂量组大鼠DAI评分、CMDI评分及血清中IL-17、MDA水平和结肠组织中PGE₂水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清中SOD水平和结肠组织中IL-2水平显著升高($P<0.01$); Ento-A中剂量组大鼠CMDI评分、HS评分以及血清中IL-8、IL-17、MDA水平和结肠组织中PGE₂、MPO水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结肠组织中IL-2水平显著升高($P<0.01$); Ento-A低剂量组大鼠HS评分以及血清中IL-17、MDA水平和结肠组织中MPO、PGE₂水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清中IL-2水平显著升高($P<0.01$)。结论:美洲大蠊提取物 Ento-A 可能通过调节免疫系统平衡、减少炎症损伤,发挥其对湿热型UC模型大鼠的改善作用。

关键词 美洲大蠊;提取物;Ento-A;湿热型溃疡性结肠炎;大鼠

Study on the Improvement Effects of *Periplaneta americana* Extract Ento-A on Rats with Damp-heat Ulcerative Colitis

ZHANG Jingna¹, TAO Lei¹, ZHANG Jun¹, WANG Muling¹, CHEN Ying², LIU Heng¹, ZHANG Chenggui¹, HE Miao¹ (1.Dali University, Key Lab of Entomological Biopharmaceutical R&D, National-Local Joint Engineering Research Center of Entomocutics/Collaborative Innovation Center for the Exploitation and Utilization of Medicinal Insects and Arachnids in Southwest China, Yunnan Dali 671000, China; 2.Dept. of Pathology, Dali Bai Autonomous Prefecture People's Hospital, Yunnan Dali 671000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect of *Periplaneta americana* extract Ento-A on damp-heat ulcerative colitis (UC) model rats. METHODS: Totally 70 rats were randomly divided into normal control group ($n=8$) and modeling group ($n=62$). The damp-heat UC model was induced in modeling group by high sugar, high fat, spicy diet combined with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid enema. 48 model rats were randomly divided into model control group, mesalazine group (300 mg/kg), Changyanning group (300 mg/kg) and Ento-A low-dose, medium-dose and high-dose (50, 100, 200 mg/kg, calculated by the extract), with 8 rats in each group. Normal control group and model control group were given normal saline intragastrically, and other groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 14 days. After last administration, disease activity index (DAI), colonic mucosal injury index (CMDI) and histopathological score (HS) of rats were determined. The spleen index, liver index and colon index in rats were determined. The serum levels of IL-8, IL-17, SOD and MDA, colonic levels of IL-2, PGE₂ and MPO were detected by ELISA. RESULTS: Compared

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860765, No.81860742, No.81660605);云南省科技厅科技计划项目(No.2018FB143);2017年度云南省地方本科高校(部分)基础研究联合专项项目(No.2017FH001-108);云南省教育厅科学研究基金产业化培育项目(No.2016CYH15);云南省教育厅科学研究基金项目(No.2017ZDX010)

* 硕士研究生。研究方向:中药抗炎与免疫药理。E-mail: zhangjingnave@163.com

通信作者:助理研究员,博士研究生。研究方向:中药抗炎与免疫药理。E-mail: mio_h@163.com

with normal control group, the DAI score, CMDI score, HS score, colonic index, the serum levels of IL-8, IL-17 and MDA, colonic levels of MPO and PGE₂ were increased significantly ($P<0.01$); serum level of SOD and colonic level of IL-2 were decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model control group, DAI score, CMDI score, serum levels of IL-17 and MDA, colonic levels of PGE₂ were decreased significantly in Ento-A high-dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$), while serum level of SOD and colonic level of IL-2 were increased significantly ($P<0.01$). CMDI score and HS score, serum levels of IL-8, IL-17 and MDA, colonic levels of PGE₂ and MPO were decreased significantly in Ento-A medium-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while colonic level of IL-2 was increased significantly ($P<0.01$). HS score, serum levels of IL-17 and MDA, colonic levels of MPO and PGE₂ were decreased significantly in Ento-A low-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while serum level of IL-2 was increased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: *P. americana* extract Ento-A may play improvement effect on damp-heat UC rats by regulating immune system balance and reducing inflammatory damage.

KEYWORDS *Periplaneta americana*; Extract Ento-A; Damp-heat ulcerative colitis; Rat

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种病因尚未明确的累及直肠和结肠的慢性非特异性炎性疾病,临床表现属中医泄泻、肠澼、痢疾、脏毒等范畴^[1]。中医临床将UC辨证分型为大肠湿热型、脾虚湿蕴型、寒热错杂型、肝郁脾虚型、脾肾阳虚型和阴血亏虚型等,其中以大肠湿热型居多^[2]。其病因多是外感内伤,湿热或寒湿化热客于肠腑,气机不畅,通降不利,血行瘀滞,肉腐血败,脂络受伤而成内疡,发为泻痢^[3]。

美洲大蠊(*Periplaneta americana* L.)又称蜚蠊,《神农本草经》列为中品,味咸,性寒,入心、肝、脾、肾经,具有活血散瘀、解毒消痞等功效^[4]。提取物Ento-A由美洲大蠊经水提醇沉后获得,主要以氨基酸、核苷、多肽类物质为主。本课题组前期研究发现,Ento-A具有增强免疫^[5]、缓解噁唑酮诱导大鼠UC的作用^[6]。基于美洲大蠊性寒的药性,可用于热证疾病的治疗。故本研究以湿热证为切入点,通过高糖高脂、辛辣饮食联合2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠法复制湿热型UC大鼠模型,考察美洲大蠊提取物Ento-A对湿热型UC模型大鼠的改善作用,为其应用于中医临床的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

HC-30118R 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);AL204-IC 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];T6新世纪型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);201 酶标仪(奥地利安图斯公司);VORTFX-5 涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);FD8-4a 冷冻干燥机(美国 Cold-Sim 公司);CX31 普通光学显微镜(重庆光学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

美沙拉嗪原料药(深圳市丽晶生化科技有限公司,批号:20140925,纯度:≥99%);肠炎宁片(江西天施康弋阳制药有限公司,批号:160303,规格:0.28 g);老白干(泸州老窖股份有限公司,批号:GB/T22045,酒精度:56% Vol);蜂蜜(桂林周氏顺发食品有限公司,批号:

GB14923);油脂(佛山市顺德区三海食品贸易有限公司,批号:GB16752);生理盐水(贵州天地药业有限责任公司,批号:20150320);前列腺素E₂(PGE₂)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号:R161002-002b)、白细胞介素2(IL-2)ELISA 试剂盒(批号:R161001-001a)均购自深圳欣博生物科技有限公司;IL-17 ELISA 试剂盒(批号:20161228)、IL-8 ELISA 试剂盒(批号:20161022)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:20161031)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20160125)和髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(批号:20161022)均购自于南京建成生物科技有限公司。

1.3 动物

健康SD大鼠70只,SPF级,体质量(200±20)g,♀♂各半,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2013-0004。健康家兔50只,♀♂不限,体质量3.0~3.5 kg,由大理大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(滇)2011-0004。本研究经大理大学实验动物伦理委员会批准,所有研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

2 方法

2.1 美洲大蠊提取物Ento-A的制备

取美洲大蠊药材5 kg,粉碎过20目筛,加水50 L,室温浸泡过夜,在95℃下回流提取3次,每次3 h;收集提取液,过滤,浓缩至相对密度为1.10~1.20;加入95%乙醇,调节含醇量为50%~70%,搅拌30 min,静置48 h,过滤,回收乙醇,浓缩至相对密度为1.05~1.10,冷藏库中放置24 h,弃去上层油脂,下层溶液过滤,滤液减压浓缩至稠膏,即得美洲大蠊提取物Ento-A,其稠膏得率为13.3%。

2.2 抗原乳化剂的制备

参考文献^[7]方法,取新鲜家兔结肠50根,用冰生理盐水冲洗干净内容物,使用盖玻片刮取结肠黏膜组织,加入适量生理盐水制成10%匀浆,于-20℃放置24 h,然后在4℃条件下以4 000 r/min离心30 min;取上清液,

再于-20℃放置24 h,然后在4℃条件下以4 000 r/min离心30 min;取上清液,冷冻干燥成冻干粉,-20℃保存。临用前配制抗原乳化剂,即精密称取上述冻干粉(8 mg/只),以生理盐水-完全弗氏佐剂(1:1, V/V)为溶剂制备成80 mg/mL的乳化液(先将冻干粉完全溶解于相应体积生理盐水中,再加入相应体积完全弗氏佐剂,涡旋混匀至乳化状态)。

2.3 造模

将70只大鼠适应性喂养1周,然后随机选取8只作为正常对照组,进行普通饲料喂养,其余62只大鼠进行湿热型UC造模。即在普通饲料喂养的基础上,喂以高糖高脂、辛辣饮食并联合TNBS灌肠:造模大鼠每天自由饮用200 g/L蜂蜜水,第2天灌服油脂15 g/kg,并于灌服油脂的隔天灌服老白干20 mL/kg,交叉灌服造模持续20 d;于湿热造模的第6天和第18天,制备抗原乳化剂,并于大鼠左侧足趾、右侧足趾、腹股沟、背部等多点皮下注射(1.0 mL/只),引起大鼠局部免疫反应;第21天,造模大鼠禁食不禁水24 h后,异氟醚轻度麻醉,俯卧位,将连有直径2.0 mm导管的注射器经大鼠肛门轻轻插入至8 cm处,缓慢注入TNBS乙醇溶液(15 mg TNBS溶于300 mL/L乙醇溶液0.6 mL中),拔出导管,使大鼠保持倒立姿态10 s,完成造模^[6]。正常对照组用生理盐水代替TNBS乙醇溶液按上述方法平行操作。

2.4 分组与给药

完成造模后第5天,参照文献标准^[9]进行疾病活动指数(Disease activity index, DAI)评分,并按炎症的严重程度对大鼠进行分层:0~3分,极轻度炎症;4~6分,轻度炎症;7~9分,中度炎症;10~12分,重度炎症^[10]。剔除极轻度炎症和重度炎症的造模大鼠后,将剩余48只大鼠随机分6组:即模型对照组、美沙拉嗪组(300 mg/kg,参考人临床等效剂量并按动物表面积法换算而得)、肠炎宁组(300 mg/kg,参考人临床等效剂量并按动物表面积法换算而得)和Ento-A低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg,以提取物计)^[6],每组8只(♀♂各半)。正常对照组和模型对照组大鼠灌胃等体积生理盐水(0.25 mL/100 g),其余各组大鼠灌胃相应药物;每天给药1次,连续给药14 d。

2.5 指标检测

2.5.1 一般情况观察和DAI评分 每天称大鼠体质量,观察大鼠一般状态及大便形状。并于给药第0、4、7、14天进行DAI评分^[9],计算每只大鼠的DAI分值评估疾病活动情况。

2.5.2 血清中IL-8、IL-17、SOD、MDA水平测定 腹主动脉采血,在4℃下以3 000 r/min离心10 min,分离上层血清,按ELISA试剂盒操作检测血清中IL-8、IL-17、SOD、MDA水平。

2.5.3 脏器指数测定 将大鼠处死,解剖后取出肝、脾和结肠,生理盐水清洗干净后,用滤纸吸干表面水分,称质量,计算脏器指数:脏器(肝、脾、结肠)指数(mg/g)=脏器湿质量(mg)/体质量(g)。

2.5.4 结肠黏膜损伤情况评定 取结肠,沿肠系膜剪开,冰生理盐水洗净内容物,平铺于白瓷板上,量取结肠长度和宽度,并参照文献标准^[11]方法进行结肠黏膜损伤(Colonmucosa damage index, CMDI)评分。

2.5.5 结肠组织中IL-2、PGE₂、MPO水平测定 将结肠纵向剪取一半,称质量,加适量冰生理盐水匀浆制成10%组织匀浆液,以3 500 r/min离心10 min,取上清液,按相应试剂盒方法操作检测匀浆液中IL-2、PGE₂、MPO水平。

2.5.6 结肠组织病理变化的检查 将结肠纵向剪取一半,用10%中性福尔马林固定,包埋,常规制作5 μm病理切片,行苏木精-伊红(HE)染色后在显微镜下观察其病理变化,并从上皮细胞和炎性细胞浸润两个方面进行病理组织学(Histopathological score, HS)评分^[12]。(1)上皮细胞:0分,正常形态;1分,有杯形细胞丢失;2分,杯形细胞大面积丢失;3分,隐窝细胞丢失;4分,隐窝细胞大面积丢失。(2)炎性细胞浸润:0分,没有浸润;1分,浸润在隐窝基底层;2分,浸润到达黏膜肌层;3分,浸润深入到黏膜肌层,伴随黏膜增厚和明显水肿;4分,浸润到达黏膜下层。每只大鼠的HS评分为“上皮细胞”评分+“炎性细胞浸润”评分。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Ento-A对湿热型UC模型大鼠一般情况的影响

正常对照组大鼠饮食正常,毛发光滑、洁白、干净,精神状态良好,体质量增加,大便(黑色)和尿液均正常。模型对照组大鼠进食减少,出现明显的体质量减轻,毛发稀疏、松散无光泽,精神状态差,出现拱背、扎堆等现象;随着造模时间推移,大鼠粪便由黑色变为黄色,且在灌油日松软、潮湿,灌酒日干燥;在造模后期,部分大鼠肛周和尾巴底部覆盖着黄色黏稠稀便,并伴有恶臭,尿量减少且发黄,此症状符合临床湿热型UC患者腹泻、里急后重、小便短赤的特点^[2]。灌胃美沙拉嗪和肠炎宁后,大鼠精神状态明显好转,活动增多,未见黄色黏稠大便,粪便基本成型转为黑色;灌胃低、中、高剂量Ento-A后,大鼠一般状态有不同程度地改善,扎堆蜷卧现象减少,肛门污秽也减少,粪便基本成型且颜色转为黑

色,体质量逐渐回升。

3.2 Ento-A对湿热型UC模型大鼠DAI评分的影响

在给药第0天时,各建模组大鼠DAI评分差异均无统计学意义($P>0.05$),并且均显著高于正常对照组($P<0.01$),这提示湿热型UC模型建立成功且各建模组大鼠炎症程度具有一致性。在给药第4天时,大鼠DAI评分统计结果与给药第0天时相似,但此时各给药组大鼠DAI评分较给药第0天时均有不同程度降低。在给药第7、14天时,模型对照组大鼠DAI评分仍显著高于正常对照组($P<0.01$),但美沙拉嗪组、肠炎宁组(给药第7、14天)以及Ento-A高剂量组(给药第14天)大鼠DAI评分已显著低于模型对照组,并且与正常对照组差异无统计学意义($P>0.05$),这提示美沙拉嗪、肠炎宁以及Ento-A对湿热型UC模型大鼠具有一定的改善作用。各组大鼠给药不同时间后的DAI评分结果见表1。

表1 各组大鼠给药不同时间后的DAI评分结果($\bar{x}\pm s$, $n=8$,分)

Tab 1 DAI scores of rats in each group after administration of different time($\bar{x}\pm s$, $n=8$, scores)

组别	剂量, mg/kg	给药时间			
		第0天	第4天	第7天	第14天
正常对照组		1.6±0.5	1.6±0.5	1.1±0.6	1.1±0.7
模型对照组		8.4±0.5**	3.3±0.9**	2.1±0.8**	2.0±0.5**
美沙拉嗪组	300	8.3±1.5**	3.0±0.9**	1.3±0.5**	1.1±0.3**
肠炎宁组	300	8.1±0.3**	3.2±1.0**	1.4±0.5**	1.2±0.5**
Ento-A低剂量组	50	8.1±0.3**	3.5±1.2**	2.1±0.6**	1.5±0.5
Ento-A中剂量组	100	8.4±0.5**	3.5±1.2**	2.1±0.6**	1.5±0.5
Ento-A高剂量组	200	8.5±0.5**	3.2±0.9**	1.5±0.5	1.4±0.5*

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:vs. normal control group,** $P<0.01$;vs. model control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.3 Ento-A对湿热型UC模型大鼠脏器指数的影响

各组大鼠的肝指数、脾指数差异均无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组比较,各建模组大鼠结肠指数均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型对照组比较,各给药组大鼠结肠指数虽有降低的趋势,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠脏器指数测定结果见表2。

3.4 Ento-A对湿热型UC模型大鼠结肠长度、宽度及CMDI评分的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠结肠长度略有缩短($P>0.05$),结肠宽度显著增加($P<0.01$),CMDI评分也显著升高($P<0.01$)。与模型对照组比较,美沙拉嗪组和Ento-A各剂量组大鼠的结肠长度均不同程度增加,但差异均无统计学意义($P>0.05$);各给药组大鼠的结肠宽度差异也无统计学意义($P>0.05$),且仍均显著宽于正常对照组($P<0.01$);各给药组大鼠结肠CMDI评分显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但仍显著高于正常对

表2 各组大鼠脏器指数测定结果($\bar{x}\pm s$, $n=8$, mg/g)

Tab 2 Viscera index of rats in each group($\bar{x}\pm s$, $n=8$, mg/g)

组别	剂量,mg/kg	肝指数	脾指数	结肠指数
正常对照组		23.57±3.80	2.14±0.40	3.12±0.44
模型对照组		29.24±3.67	2.23±0.32	6.22±2.94**
美沙拉嗪组	300	28.27±5.73	2.17±0.58	5.54±2.06**
肠炎宁组	300	27.16±4.93	1.91±0.97	4.97±0.80*
Ento-A低剂量组	50	35.47±11.98	2.50±0.90	6.22±1.87**
Ento-A中剂量组	100	31.85±7.92	1.87±0.88	5.90±2.06**
Ento-A高剂量组	200	32.94±10.19	2.36±1.02	5.06±0.95**

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:vs. normal control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

照组($P<0.01$)。与美沙拉嗪组比较,肠炎宁组和Ento-A中、高剂量组大鼠CMDI评分仍显著升高($P<0.05$),但肠炎宁组和Ento-A各剂量组大鼠间CMDI评分差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠结肠长度、宽度及CMDI评分结果见表3。

表3 各组大鼠结肠长度、宽度及CMDI评分结果($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 3 Colon length, colon width and CMDI scores of rats in each group($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量,mg/kg	长度,cm	宽度,cm	CMDI评分
正常对照组		17.95±1.49	0.77±0.08	0.6±0.5
模型对照组		15.71±2.15	1.54±0.83**	3.7±0.5**
美沙拉嗪组	300	17.37±1.97	1.40±0.79**	1.7±0.8***
肠炎宁组	300	15.69±1.96	1.59±0.61**	2.7±0.8*** ^Δ
Ento-A低剂量组	50	17.12±2.50	1.77±0.84**	3.1±0.8***
Ento-A中剂量组	100	17.01±2.28	1.62±0.68**	2.7±1.0*** ^Δ
Ento-A高剂量组	200	16.07±2.97	1.58±0.83**	2.7±1.1*** ^Δ

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与美沙拉嗪组比较,^Δ $P<0.05$

Note:vs. normal control group,** $P<0.01$;vs. model control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$;vs. mesalazine group,^Δ $P<0.05$

3.5 Ento-A对湿热型UC模型大鼠血清中IL-8、IL-17、SOD、MDA水平的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠血清中IL-8、IL-17、MDA水平显著升高($P<0.01$),SOD水平显著降低($P<0.01$)。与模型对照组比较,美沙拉嗪组、肠炎宁组大鼠血清中IL-8、IL-17、MDA水平均显著降低($P<0.01$),SOD水平均显著升高($P<0.01$),但两组大鼠血清中IL-8、IL-17水平仍显著高于正常对照组($P<0.01$);Ento-A各剂量组大鼠血清中IL-17、MDA水平和Ento-A中剂量组大鼠血清中IL-8水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Ento-A高剂量组大鼠血清中SOD水平显著升高($P<0.01$),并且Ento-A高剂量组大鼠血清中SOD水平和各给药组大鼠血清中MDA水平与正常对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。与美沙拉嗪组比较,Ento-A各剂量组大鼠血清中IL-8水平和Ento-A高剂量组大鼠血清中IL-17水平仍显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),En-

to-A 低、中剂量组大鼠血清中 SOD 水平仍显著降低 ($P < 0.01$), 其余指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与肠炎宁组比较, Ento-A 各剂量组大鼠血清中 IL-8 水平和 Ento-A 高剂量组大鼠血清中 IL-17 水平同样显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠血清中 IL-8、IL-17、SOD、MDA 水平测定结果见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 IL-8、IL-17、SOD、MDA 水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 4 Serum levels of IL-8, IL-17, SOD and MDA of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量, mg/kg	IL-8, pg/mL	IL-17, pg/mL	SOD, U/mL	MDA, nmol/mL
正常对照组		37.65 ± 5.56	34.18 ± 5.79	0.46 ± 0.04	0.31 ± 0.11
模型对照组		119.90 ± 20.78**	91.58 ± 9.19**	0.32 ± 0.04**	0.87 ± 0.69**
美沙拉嗪组	300	75.16 ± 9.62***	75.44 ± 9.43***	0.45 ± 0.06**	0.37 ± 0.14**
肠炎宁组	300	80.34 ± 12.04***	75.68 ± 6.45***	0.44 ± 0.08**	0.28 ± 0.05**
Ento-A 低剂量组	50	100.66 ± 10.30*** ^Δ [∇]	79.53 ± 7.69***	0.35 ± 0.03*** ^Δ	0.34 ± 0.08**
Ento-A 中剂量组	100	94.45 ± 11.64*** ^Δ [∇]	73.44 ± 6.42***	0.36 ± 0.03*** ^Δ	0.40 ± 0.11**
Ento-A 高剂量组	200	107.45 ± 6.11*** ^Δ [∇]	62.23 ± 7.59*** ^Δ [∇]	0.47 ± 0.04**	0.28 ± 0.12**

注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与美沙拉嗪组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$;与肠炎宁组比较, [∇] $P < 0.05$, ^{∇∇} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. mesalazine group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; vs. Changyanning group, [∇] $P < 0.05$, ^{∇∇} $P < 0.01$

3.6 Ento-A 对湿热型 UC 模型大鼠结肠组织中 IL-2、MPO、PGE₂ 水平的影响

与正常对照组比较, 模型对照组大鼠结肠组织中 IL-2 水平显著降低 ($P < 0.01$), MPO、PGE₂ 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 各给药组大鼠血清中 IL-2 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但仍然显著低于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 除 Ento-A 高剂量组外, 其余各给药组大鼠结肠组织中 MPO 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 各给药组大鼠结肠组织中 PGE₂ 水平均显著降低 ($P < 0.01$), 并且其中 Ento-A 中剂量组与正常对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与美沙拉嗪组比较, Ento-A 各剂量组大鼠结肠组织中 IL-2 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与肠炎宁组比较, Ento-A 中、高剂量组大鼠结肠组织中 IL-2 水平显著升高 ($P < 0.05$)。各组大鼠结肠组织中 IL-2、MPO、PGE₂ 水平测定结果见表 5。

3.7 Ento-A 对湿热型 UC 模型大鼠结肠黏膜病理变化的影响

正常对照组大鼠结肠各层结构完整、清晰, 腺体排列整齐, 可见明显的隐窝和杯状细胞, 基本无充血水肿、炎性细胞浸润现象。模型对照组大鼠结肠黏膜表层脱落、缺损, 隐窝和杯状细胞大面积丢失, 大量炎性细胞浸

表 5 各组大鼠结肠组织中 IL-2、MPO、PGE₂ 水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 5 The levels of IL-2, MPO, and PGE₂ in colon tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量, mg/kg	IL-2, pg/mL	MPO, U/g	PGE ₂ , ng/L
正常对照组		469.83 ± 99.16	0.25 ± 0.04	141.66 ± 24.38
模型对照组		137.14 ± 44.35**	0.39 ± 0.24**	300.76 ± 51.07**
美沙拉嗪组	300	189.75 ± 78.18***	0.28 ± 0.10**	203.92 ± 79.42***
肠炎宁组	300	216.37 ± 92.89***	0.29 ± 0.10**	225.02 ± 28.08***
Ento-A 低剂量组	50	290.25 ± 51.09*** ^Δ	0.33 ± 0.04**	198.71 ± 25.56***
Ento-A 中剂量组	100	338.72 ± 48.08*** ^Δ [∇]	0.30 ± 0.04**	158.17 ± 27.55**
Ento-A 高剂量组	200	351.88 ± 108.63*** ^Δ [∇]	0.38 ± 0.11*	189.31 ± 50.59***

注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与美沙拉嗪组比较, ^Δ $P < 0.05$;与肠炎宁组比较, [∇] $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. mesalazine group, ^Δ $P < 0.05$; vs. Changyanning group, [∇] $P < 0.05$

润。各给药组大鼠结肠杯状细胞和隐窝均出现不同程度修复好转, 炎性细胞浸润减少。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠上皮细胞评分、炎性细胞评分及 HS 评分均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 美沙拉嗪组和 Ento-A 低、中剂量组大鼠的上皮细胞评分、HS 评分以及美沙拉嗪组、Ento-A 中剂量组大鼠炎性细胞评分均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且美沙拉嗪组、Ento-A 低剂量组、Ento-A 中剂量组大鼠上皮细胞评分和美沙拉嗪组、Ento-A 中剂量组大鼠炎性细胞评分以及 Ento-A 中剂量组大鼠 HS 评分与正常对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与美沙拉嗪组比较, Ento-A 各剂量组大鼠上皮细胞评分、炎性细胞评分及 HS 评分差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与肠炎宁组比较, Ento-A 中剂量组大鼠上皮细胞评分显著降低 ($P < 0.05$), 其余指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠 HS 评分结果见表 6, 结肠组织病理切片图见图 1。

表 6 各组大鼠 HS 评分结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$, 分)

Tab 6 HS scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$, scores)

组别	剂量, mg/kg	上皮细胞评分	炎性细胞评分	HS 评分
正常对照组		1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
模型对照组		3.0 ± 0.9**	3.0 ± 0.5**	6.0 ± 1.4**
美沙拉嗪组	300	1.7 ± 0.7**	1.9 ± 0.8*	3.6 ± 1.4**
肠炎宁组	300	2.5 ± 0.8**	2.5 ± 0.8**	5.0 ± 1.5**
Ento-A 低剂量组	50	1.9 ± 1.1*	2.1 ± 1.1*	4.0 ± 2.2**
Ento-A 中剂量组	100	1.6 ± 0.9** [∇]	1.9 ± 0.8*	3.5 ± 1.7**
Ento-A 高剂量组	200	2.5 ± 1.4**	2.6 ± 0.5**	5.1 ± 2.9**

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与肠炎宁组比较, [∇] $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. Changyanning group, [∇] $P < 0.05$

4 讨论

本研究采用饮食结合免疫复合的方法复制了与人

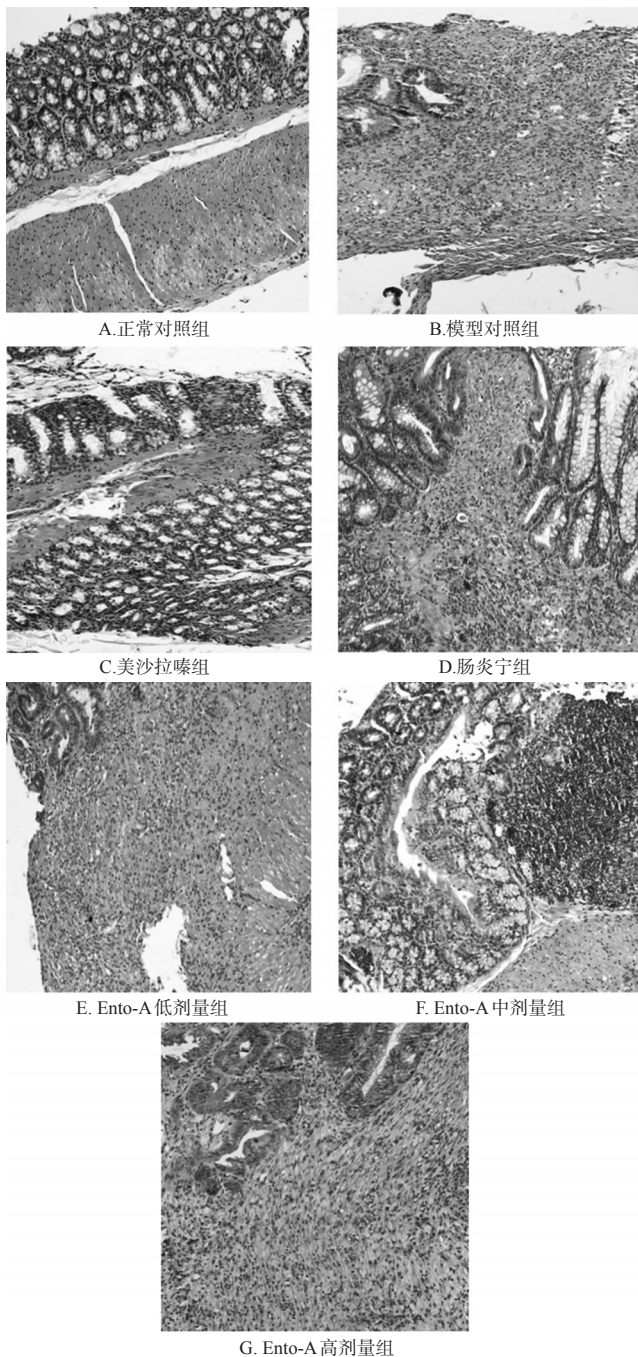


图1 各组大鼠结肠组织病理切片图(HE染色, ×200)
 Fig 1 Histopathological sections of colon of rats in each group(HE staining, ×200)

临床症状及肠道病变较为接近的湿热型UC大鼠模型,此模型能达到全身免疫异常与局部炎症病变结合,肠黏膜屏障损害与免疫调节失衡结合,是较理想的研究病理机制及中药干预作用的中医证候UC动物模型。本研究分别选取化学药美沙拉嗪和中药制剂肠炎宁为阳性对照药。其中,美沙拉嗪作为临床一线化学药,其主要作用于肠道炎症黏膜,对肠壁的炎症有显著的抑制作用;肠炎宁为临床治疗UC的常用中药制剂,具有清热利湿、行气的作用,常用于大肠湿热所致的泄泻^[13-14]。选择以

上两个不同类型的药为阳性对照,旨在从中药和化学药两个层面进行比较来评价Ento-A对湿热型UC模型大鼠的改善作用。

UC以腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重为主要临床表现,病变主要累及直肠和远端结肠的黏膜层及黏膜下层,且病程迁延不愈^[15]。在本研究中,大鼠造模后进食减少,体质量减轻,毛发稀疏松散、无光泽,精神状态差,粪便呈黄色稀便,血便,并伴有恶臭,尿液量减少且发黄,DAI评分和CMDI评分均显著升高($P < 0.01$);病理组织检查结果也显示,结肠黏膜表层脱落缺损,隐窝和杯状细胞大面积丢失,大量炎性细胞浸润,HS评分显著升高($P < 0.01$)。结合大鼠一般情况和病理检查结果,建模后大鼠具备腹泻黏液脓血便、里急后重2项主症和小便短赤1项次症,可认为发生了湿热型UC样病变^[16]。灌胃Ento-A后,大鼠精神状态明显好转,活动增多,体质量回升,粪便基本成型且转为黑色;且病理组织检查结果也显示,结肠杯状细胞和隐窝均出现不同程度的修复,炎性细胞浸润减少。以上结果提示,Ento-A可改善湿热型UC模型大鼠的症状,修复肠黏膜损伤。

IL-2是由辅助性T淋巴细胞1型(Th1细胞)分泌的特征性细胞因子,其表达水平降低会引起T淋巴细胞免疫清除能力降低,进而导致肠黏膜溃疡形成^[17]。IL-17为辅助性T淋巴细胞17(Th17细胞)分泌的促炎因子,Th17细胞可通过IL-17的促炎作用调节细胞免疫^[18]。通常认为Th1与Th17介导的免疫反应相互拮抗^[19]。本研究结果显示,造模后大鼠血清中IL-17水平显著升高、IL-2水平显著降低,这与临床上湿热型UC患者血清中IL-17、IL-2水平的变化趋势一致^[20-21]。灌胃Ento-A后,大鼠血清中IL-17水平降低、IL-2水平升高,这提示Ento-A可能通过参与调节机体免疫功能发挥其对湿热型UC模型大鼠的改善作用。

IL-8是一种炎性趋化性因子,可趋化并激活中性粒细胞,导致溶酶体酶活性和吞噬作用增强,产生大量毒性物质,加重肠道黏膜炎症反应^[22]。PGE₂能增加血管通透性,引起组织水肿,对白细胞有趋化、聚集作用,直接加重炎症反应^[23]。MPO和白细胞计数通常是反映炎症程度的重要指标,MPO水平越高,则炎症程度越高^[24]。MDA是氧自由基脂质过氧化反应的产物,可加重机体组织损害^[25]。SOD是机体天然存在的抗氧化酶,其含量高低间接反映机体清除氧自由基及促进损伤组织修复的能力^[26]。本研究结果显示,灌胃Ento-A后,湿热型UC模型大鼠血清中IL-8水平有降低的趋势,PGE₂、MPO及MDA水平均显著降低($P < 0.01$),SOD水平显著升高($P < 0.01$)。以上结果提示,Ento-A可降低促炎因子表达,调节机体活性氧的形成和抗氧化系统平衡,进而改善湿热型UC模型大鼠的症状。另外,Ento-A给药后,部

分测定指标无剂量依赖性关系,即部分指标在高剂量Ento-A给药后变化反而不明显。笔者推测可能原因有以下两点:第一,Ento-A作为中药提取物是多成分的复杂体系,人体则是更为复杂的生命系统,这就决定了中药的药效和作用机制具有复杂的非线性特征,表现出多成分、多层次、多靶点、多代谢途径的特点;其次,Ento-A的主要成分为多肽类物质,其经口给药后具有十分明显的首关效应,且蛋白多肽类药物的吸收、结合和消除均可能涉及非线性饱和和动力学的特点。后续笔者将通过灌肠或其他方式给药,比较Ento-A对湿热型UC大鼠的改善作用。

综上所述,Ento-A对湿热型UC模型大鼠具有一定的改善作用,其作用机制可能与参与调节机体免疫功能,减少炎症因子生成,调节机体活性氧的形成和抗氧化系统平衡有关。

(致谢:感谢大理大学药学院药理教研室陈俊雅实验师、大理大学动物实验中心吴定宇讲师和杨琴讲师及大理大学药学院2015级药理学本科生陈成、于跃、李伯隆、梁曼玉、张林飞对本课题组的支持!)

参考文献

[1] 刘丹,李桂贤,王雪,等.中医药治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J].湖南中医杂志,2017,33(3):167-169.

[2] 张声声,沈洪,郑凯,等.溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中华中医药杂志,2017,32(8):3585-3589.

[3] 刘经州,马东旺.溃疡性结肠炎的中医辨证及用药研究[J].吉林中医药,2010,30(8):665-667.

[4] 高洁,朱娟娟,刘瑾华,等.美洲大蠊提取物促组织修复作用机制研究进展[J].四川动物,2019,38(2):235-240.

[5] 唐苗,余万鑫,吴桃清,等.美洲大蠊提取物Ento-A对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J].中国药理学通报,2018,34(1):72-76.

[6] 张汉超,张成桂,耿福能,等.美洲大蠊提取物Ento-A对噁唑酮致大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用研究[J].中药材,2017,40(6):1420-1424.

[7] 余万鑫,张俊,唐苗,等.康复新对湿热型大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及机制初探[J].中国药理学杂志,2018,53(11):882-887.

[8] 葛曼青,巫玉兰,陈轩.加味白头翁汤灌肠液治疗活动期湿热型溃疡性结肠炎大鼠疗效观察[J].检验医学与临床,2019,16(7):934-938.

[9] ZHENG L, ZHANG YL, DAI YC, et al. Jianpi Qingchang decoction alleviates ulcerative colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB activation[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(7):1180-1188.

[10] 刘胜帅,王朋川,徐雨生,等.美洲大蠊提取物Ento-B对2,4-二硝基氯苯联合醋酸诱导大鼠溃疡性结肠炎的作用及机制初探[J].时珍国医国药,2018,29(10):2313-2316.

[11] YUW G, LU B, ZHANG HW, et al. Effects of the Sijunzi decoction on the immunological function in rats with dextran sulfate-induced ulcerative colitis[J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(1):83-86.

[12] 崔丽君.半夏泻心汤免疫调节作用对BMSCs移植治疗UC细胞定植状态的影响[D].济南:山东中医药大学,2015.

[13] 华宏军,陈跃华,腾卫军.美沙拉嗪口服联合灌肠治疗溃疡性结肠炎疗效观察[J].浙江临床医学,2013,15(8):1192-1193.

[14] 马丽,张妙红,邓青,等.肠炎宁浸膏粉对大鼠溃疡性结肠炎模型实验研究[J].中南药学,2014,12(4):343-345.

[15] 刘岩,李连泰,计小清,等.黄芩-白芍药对改善小鼠溃疡性结肠炎的作用及机制研究[J].中国药房,2018,29(3):356-360.

[16] 李军祥,陈詒.溃疡性结肠炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J].中国中西医结合消化杂志,2018,26(2):105-111,120.

[17] 古学文.溃疡性结肠炎患者血清IL-2及sIL-2R浓度变化的研究[J].临床和实验医学杂志,2003,2(3):153-155.

[18] 申青艳,谭海成,周滔,等.解毒化湿健脾法对实验性溃疡性结肠炎Th17细胞表达的作用[J].环球中医药,2018,11(1):2-6.

[19] 岳文杰,刘懿,徐薇,等.溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜中IL-2、IL-4、IL-17和IL-10的表达特点及其与疾病活动度的关系[J].复旦学报(医学版),2012,39(5):454-459.

[20] 马丽群,韩强,王波.清肠祛湿汤对溃疡性结肠炎(大肠湿热证)患者临床症状的改善作用及免疫机制调节研究[J].四川中医,2018,36(10):112-114.

[21] 冯锦山,王士群,陈平湖,等.溃疡性结肠炎患者血清IL-10、IL-13和IL-17水平与湿热证关系研究[J].时珍国医国药,2013,24(5):1261-1262.

[22] 孔梅,王莺,邢长永.白头翁汤干预溃疡性结肠炎中性粒细胞凋亡、IL-8研究[J].中华全科医学,2010,8(8):1018-1020.

[23] 闫曙光,周永学,惠毅,等.乌梅丸拆方对TNBS诱导大鼠溃疡性结肠炎治疗作用的研究[J].中华中医药杂志,2012,27(4):890-895.

[24] 时丹丹,王乾,谢培,等.半夏泻心汤及其拆方对TNBS致溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织细胞因子的影响[J].陕西中医药大学学报,2018,41(5):114-118.

[25] 柳越冬,陶弘武.加味通腑汤对溃疡性结肠炎大鼠超氧化物歧化酶和丙二醛影响的研究[J].中华中医药学刊,2017,35(4):775-778.

[26] 张林,张伟,解岚岚,等.青柏溃结汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜SOD及MDA影响的研究[J].中国中医急症,2018,27(4):630-632.

(收稿日期:2019-10-08 修回日期:2019-11-21)

(编辑:林静)