解毒化瘀方对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4、NF－κB 的影响*

屈杰 李小会 谭颖颖 杨景锋
（陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046）

摘 要：目的 通过观察解毒化瘀方对溃疡性结肠大鼠结肠组织中 TLR4、NF－κB 表达的影响，探讨其治疗溃疡性结肠炎的作用机制。**方法** 采用 TNBS/乙醇复制溃疡性结肠炎大鼠模型，随机分为空白组、模型组、西药组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组。治疗两周后，免疫组化法测定大鼠结肠组织中的 TLR4、NF－κB 的表达。**结果** 与空白组比较，模型组中的 LR4、NF－κB 表达升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各治疗组均能降低 LR4、NF－κB 的表达，其中西药治疗组与中药高剂量组作用最明显（$P<0.05$）。**结论** 解毒化瘀方可能通过降低 TLR4、NF－κB 的表达发挥抗炎作用。

关键词：解毒化瘀方；溃疡性结肠炎；核因子 κB；Toll 样受体
中图分类号：R573.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672－0571(2020)01－0024－04
DOI：10.13424/j.cnki.mtcm.2020.01.006

Effect of Toxicity and Blood Stasis Removing Recipe on TLR4 and NF－κB in Rats with Ulcerative Colitis

Qu Jie, Li Xiaohui, Tan Yingying, Yang Jingfeng
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang China, 712046)

Abstract: Objective To explore the mechanism of the treatment of ulcerative colitis (UC) by observing the effect of Toxicity and Blood Stasis Removing Recipe on the expression of TLR4 and NF－κB in the colonic tissue of UC rats. **Methods** Rat models of ulcerative colitis were replicated using TNBS / ethanol and randomly divided into blank group, model group, Western medicine group, high－dose Chinese medicine group, medium－dose Chinese medicine group, and low－dose Chinese medicine group. After two weeks of treatment, the expression of TLR4 and NF－κB in colon tissue of rats was determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank group, the expression of LR4 and NF－κB were increased in the model group ($P<0.01$); compared with the model group, the expression of LR4 and NF－κB was reduced in each treatment group, especially in the Western medicine group and the high－dose Chinese medicine group ($P<0.05$). **Conclusion** Toxicity and Blood Stasis Removing Recipe may exert an anti－inflammatory effect by reducing the expression of TLR4 and NF－κB.

Key words: Toxicity and Blood Stasis Removing Recipe; ulcerative colitis; NF－κB; Toll－like receptor

解毒化瘀方是课题组经过多年临床研究、实验研究获得的治疗溃疡性结肠炎的有效方剂，其源于古方《伤寒杂病论》中的白头翁汤。临床应用治疗此类疾病多年，具有缓解腹痛、腹泻症状快，

* **基金项目：**陕西中医药大学科学研究计划项目（2017PY23）

副作用小,患者耐受性好等多方面的优点,但是其治疗本病的分子生物学机制不甚清楚[1]。本研究通过观察解毒化瘀方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 TLR4、NF－κB 表达的影响,探讨其治疗溃疡性结肠炎的作用机制。

1 材料

1.1 *动物* 健康雄性 SD 大鼠,体重(160±20)g,由成都达硕实验动物有限公司提供,合格证号:SCXK2018－25.

1.2 *实验药物与试剂* 解毒化瘀方组成:白头翁 10g,黄柏 10g,黄连 10g,葛根 15g,赤石脂 15g,乌梅 15g,赤芍 15g,甘草 6g。从西安宏德中医院购买,并通过专业中药师鉴定,结果合格。阳性对照药物为美沙拉嗪缓释颗粒,进口药品注册证号:H201800083,爱的发制药公司。多聚甲醛,批号:20180880,规格:400g/瓶,天津市劲风化工公司生产;透明试剂:二甲苯,批号:20180386,规格 400ml/瓶,长沙科荣化工试剂厂;TLR4 兔多克隆抗体,批号:bs－4836R,北京博奥森生物技术有限公司;NF－B p65,兔多克隆抗体,批号:bs－0465R;北京博奥森生物技术有限公司。

2 方法

2.1 *造模方法* 实验大鼠,给予普通饲料适应性饲养一周后,采用三硝基苯磺酸复制溃疡性结肠炎实验动物模型。大鼠先禁食不禁水 12 小时,然后采取大鼠腹腔注射麻醉法,麻醉成功后固定。取一支直径约 3mm、长约 10cm 的塑料管,清洗干净后用肥皂水适当润滑,从大鼠肛门经肠道逆行缓缓插入结肠,深度保持在 8cm 处。按照体重 100mg/kgTNBS(三硝基苯磺酸)加入等体积 50%乙醇混合配置好药物混合液。使用一次性注射器吸入混合液,缓慢推入大鼠肠道内,然后再推入约 0.5mL 空气。将大鼠头向下倾斜 45°放置半小时,使大鼠保持平躺至自然清醒。空白组大鼠按上述方法给予等量生理盐水灌肠。

2.2 *中药制备* 解毒化瘀方加入 30 倍体积纯净水,浸泡 1 小时,武火煮沸,文火煎煮 30 分钟,去药渣,收集药液,进一步浓缩至 500ml,－20℃保存,用时调至所需浓度。

2.3 *实验分组与给药* SD 大鼠 60 只,随机分为空白组、模型组、阳性对照组、中药高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组 10 只。空白组、模型组等体积生理盐水灌胃,中药各治疗组灌服解毒化瘀方中药,中药高中低治疗组剂量分别为:16.4g/(kg·d)、8.2g/(kg·d)、4.1g(kg·d),西药治疗组为 0.279g/(kg·d)。各组大鼠每天灌胃 1 次,连续 2 周。

2.4 *标本采集与检测* 治疗结束后,实验动物禁食不禁水过夜,次日麻醉后,手术切开大鼠腹腔,逐步分离结肠组织,在距肛门 2cm 处向上,剪取 5cm 长度结肠组织,并沿肠系膜纵轴方向切开大鼠肠管,肉眼细致观察结肠病变情况。在肉眼观察损伤最明显部分取长为 1.8cm 结肠,使用生理盐水反复冲洗干净后,使用甲醛溶液固定。组织采用全自动脱水机脱水、包埋、切片后,开展免疫组化实验。

2.5 *统计学方法* 本次数据选用 SPSS21.0 统计软件,计量资料采用均数标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较用多因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 *大鼠造模后一般情况* 模型组大鼠造模后相继出现精神较差,蜷缩懒动,反应迟缓,大便粘液状,有少量脓血,进食量减少,长期粘液稀便,毛色萎黄无光泽,后期甚至出现斑片状脱毛,体重增长缓慢。

正常组大鼠,进食、活动、二便等情况正常。

3.2 *结肠组织病理学改变* 空白组情况:结肠组织形态结构完好,未见变性、坏死脱落情况,未见增生肠化及鳞状化生,但在粘膜下层偶见充血水肿。

模型组情况:在结肠粘膜固有层,可见较多炎细胞浸润,并且炎细胞部分扩展至粘膜下层,部分粘膜肌层出现轻度变厚。

治疗组情况:与模型组比较,送检结肠粘膜固有层有少许炎细胞浸润,未见粘膜肌层增厚及粘膜下层充血水肿。具体见下图 1。

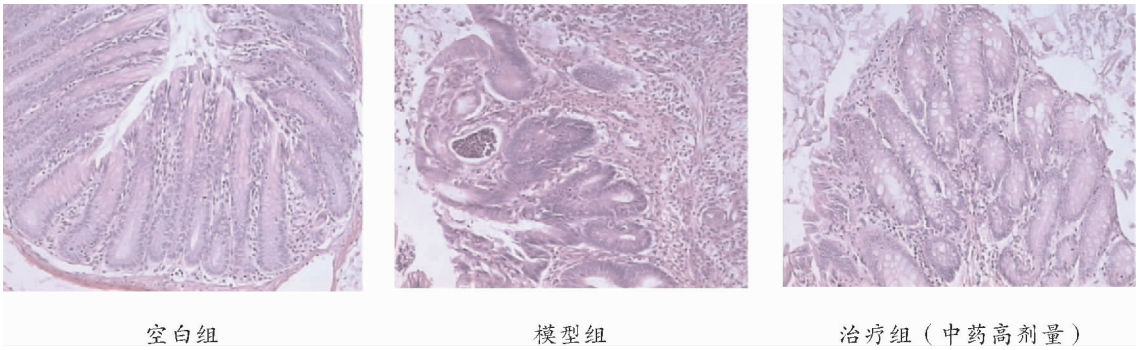

图 1 结肠组织 HE 染色 ×200

3.3 结肠组织中 TLR4 表达 结果见表 1 显示；与空白对照组相比，模型对照组大鼠结肠组织 TLR4 蛋白表达明显升高，具有统计学意义（$P<0.01$）；与模型对照组相比，各治疗组 TLR4 蛋白表达下降，其中西药组、高剂量组大鼠结肠组织 TLR4 蛋白含量降低，具有统计学意义（$P<0.05$）；中剂量组、低剂量组大鼠结肠组织 TLR4 蛋白含量无明显差异，不具备统计学意义。

表 1 大鼠结肠 TLR4 蛋白平均光密度的影响（$\bar{x}\pm S$）

组别	n	OD（$\bar{x}\pm S$）
空白对照组	9	0.1682 ± 0.0135
模型对照组	9	0.2174 ± 0.0119 **
西药组	8	0.2004 ± 0.0027 △
高剂量组	7	0.2012 ± 0.0100 △
中剂量组	8	0.2089 ± 0.0118
低剂量组	8	0.2058 ± 0.0108

注：空白对照组相比，** $P<0.01$；模型对照组相比，△ $P<0.05$ 。

3.4 结肠组织中 NF－κB 表达 与空白对照组相比，模型对照组大鼠结肠组织 NF－κB 蛋白含量明显升高（$P<0.01$）；与模型对照组相比，西药组、中药高剂量大鼠结肠组织 NF－κB 蛋白含量降低，具有统计学意义（$P<0.05$）见表 2。组织染色见图 1。

表 2 大鼠结肠 NF－κB 平均光密度的影响（$\bar{x}\pm S$）

组别	n	OD（$\bar{x}\pm SD$）
空白对照组	9	0.1358 ± 0.0135
模型对照组	9	0.3201 ± 0.0158 **
西药组	8	0.2597 ± 0.0137 △
高剂量组	7	0.2619 ± 0.0144 △
中剂量组	8	0.2758 ± 0.0126
低剂量组	8	0.2679 ± 0.0153

注：空白对照组比，* $P<0.05$ ， ** $P<0.01$；与模型对照组相比，△ $P<0.05$ ， △△ $P<0.01$。

4 讨论

溃疡性结肠炎的发病病因不是十分清楚，目前表明与外界环境因素、遗传家族史、饮食结构等存在一定的关系[2]。但是关于其发病机制，大部分研究者倾向于认为，此病与免疫反应异常有关[3]。因为之前的研究发现，溃疡性结肠炎患者中，与免疫炎症有关遗传易感基因如白介素受体、肿瘤坏死因子基因等明显高于健康人群。同时临床医学表明，结肠炎患者结肠粘膜有大量炎症细胞浸润，使用激素或者免疫抑制药物干预后，症状可以有效缓解，病理组织学可以得到改善[4]。TOLL 样受体是机体内重要的参与肠粘膜免疫反应的介质，在机体淋巴细胞、肠粘黏上皮细胞中表达较高。目前发现，结肠炎患者中 TLR4 表达显著升高，其活化与高表达可以激活相应的炎症通路，加重其他炎症因子释放，引起肠黏膜病理损害[5]。目前发现 TLR4/NF－κB 的通路在本病的发病机制中十分重要，其通路中的相关酶如 MyD88 以及活性抑制剂一旦被细胞因子、病毒等刺激激活，可以导致下游炎症因子如 IL－8、TNF－a 等大量释放，加重病情。目前许多清热解毒中药乳黄连、白花蛇舌草、黄柏等有效成分的抗炎机制与此通路关系密切，多与抑制 TLR4/NF－κB 的过渡表达，下调相关炎症因子释放有关[6]。

溃疡性结肠炎相当于中医学中的“下利”“泄泻”等病[7]，病位主要在脾胃、肠道，发病与禀赋不足，饮食不慎，情志不调密切相关[8]，病机与脾失健运、湿热内蕴、肠络受损有关。传统的治疗主要有健脾止泻、疏肝健脾、温补脾肾、清热利湿等治法[9]。本团队长期致力于中医药（下转第 32 页）

难以化物,口气秽浊。故以五苓散为主,温阳化气,利水通阳。可见,在临床实际运用叶天士“通阳不在温,而在利小便”法时,可不拘泥于疾病的病名,只要正中病机,即可大胆使用,而“不在温”,也不是绝对的不使用温热药。

4 讨论

《内经》对五郁之证提出了以“返其自然之常”的因势利导法为其根本治法,《伤寒杂病论》萌发了通阳思想,陈士铎将外感湿热之邪与郁证进行了联系,董宿则站在郁证的角度,提出了不可滥用温热药解郁,此些观点在历史的长河里,为叶天士在温病中提出“通阳”之法奠定了理论基础。但叶天士提出“通阳”,示人以规矩,亦非独温病可用,只要机理相同,大可使用。正如医家杨琼[7]认为,湿热病通阳法蕴含了中医治疗八法中除吐法以外的汗、下、和、温、清、消、补七法,是通过化湿、行气、温振、柔润以及调和阴阳等方法达到祛湿通阳退热的目的。故学习“通阳不在温,而在利小便”重在学习其治病思想,审证求因、灵活运用,如此方可大大提高临床疗效。

参考文献

[1]魏小明,孙毅. 浅谈“通阳不在温,而在利小便”临床应用[J]. 中国老年保健医学,2019,7(2):125 - 126.
[2]朱开然,余德惠,雷根平. 辨析“通阳不在温,而在利小便”[J]. 四川中医,2017,35(4):29 - 31.
[3]叶天士. 临证指南医案[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:25.
[4]黄帝内经[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:46.
[5]叶峥嵘. 中医郁证理论的历史发展源流探析[J]. 现代中医药,2013,33(2):72 - 75.
[6]汤念翥. “火郁发之”在眼科清热方剂中的应用[J]. 中国中医眼科杂志,1997,7(4):45 - 46.
[7]杨琼,吕文亮,刘林. 浅述湿热病通阳法及其临床应用[J]. 湖北中医药大学学报,2018,20(4):61 - 63.

(收稿日期:2019 - 05 - 24 **编辑:**杨芳艳)

(上接第 26 页) 治疗胃肠病研究,创立的解毒化瘀方是在中医学方证相应、专病专方的思路上,借鉴当代著名脾胃病专家李培教授治疗溃疡性性结肠炎的学术思想和用药的基础上创立,此方紧扣溃疡性结肠热毒炽盛、毒瘀络损的病理特点,方药中融合了清热解毒、凉血化瘀、酸涩收敛等中医治痢疾的特色[10]。通过本实验表明,解毒化瘀方具有降低炎症细胞表达,修复肠粘黏组织的作用,其机制与抑制 TLR4 的表达以及进而抑制 NF - κB 的活化有关,但是由于 TLR4/NF - κB 通路的活化机制以及上下游的关系作用十分复杂,具体机制尚需进一步研究。

参考文献

[1]屈杰,谭万初,徐春霞,等. 从湿热夹瘀论治溃疡性结肠炎急性发作期治疗[J]. 四川中医,2014,5(32):32 - 33.
[2]中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 胃肠病学. 2007,12(8):488 - 495.
[3]屈杰,赵天才. 中医药治疗溃疡性结肠炎研究概况[J]. 中国民族民间医药,2018,27(8):48 - 51.
[4]于振海,陈立东,王志强,等. Toll 样受体 4、NF - κB 在溃疡性结肠炎中的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2010,26(7):650 - 652.
[5]戴路明,朱磊,沈洪. 基于 β_2AR/β - arrestin2/NF - κB 信号通路的清肠化湿颗粒防治溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(9):86 - 94.
[6]朱磊,沈洪,顾培青,等. 黄芩苷对溃疡性结肠炎模型大鼠炎性反应、凋亡的影响及与 PI3K/AKT 通路的关系[J]. 中华中医药杂志,2017,32(9):4001 - 4004.
[7]彭艳红. 溃疡性结肠炎中医病名源流探析[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(3):138 - 139.
[8]李春雷,陈治水. 陈治水教授治疗溃疡性结肠炎临床经验[J]. 中国中西医结合杂志,2008,16(2):112 - 114.
[9]徐艺. 单兆伟论治缓解期溃疡性结肠炎的经验总结[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(12):2311 - 2312.
[10]屈杰,孔文霞,李培. 李培治疗溃疡性结肠炎学术经验总结[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(9):1821 - 1824.

(收稿日期:2019 - 09 - 11 **编辑:**方亚利)