

蒙药嘎日迪散对大鼠溃疡性结肠炎的作用

王琳^{1,2}, 裴玲燕¹, 李树春¹, 崔箭¹

(1. 中央民族大学 中国少数民族传统医学国家民委—教育部重点实验室, 北京 100081;

2. 新乡医学院 组织学与胚胎学教研室, 河南 新乡 453007)

摘要:目的:探讨嘎日迪散对大鼠溃疡性结肠炎的作用. 方法:采用免疫法复合 TNBS 诱导法制作溃疡性结肠炎模型,从宏观和微观评价嘎日迪散对大鼠溃疡性结肠炎的治疗效果. 结果:动物疾病活动指数、结肠粘膜损伤指数、结肠粘膜镜下评分的结果显示,各给药组和模型组相比具有统计学意义,HE 结果显示,模型组还存在典型的溃疡,各给药组粘膜修复良好. 结论:嘎日迪散能有效治疗大鼠溃疡性结肠炎,其作用和阳性药柳氮磺吡啶及补脾益肠丸相当.

关键词:蒙药嘎日迪散;溃疡性结肠炎;野罂粟;阿给

中图分类号:Q949.95;R285.5

文献标志码:A

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)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黏膜层,以溃疡为主,多累及直肠和远端结肠,也可遍及整个结肠^[1]. 如不及时治疗,可能会发生中毒性巨结肠、结肠穿孔、下消化道出血等并发症,严重影响患者的生活质量^[2].

在蒙医中,溃疡性结肠炎属“宝如病”的范畴,蒙医认为该病是巴达干、赫依、希拉、血、黄水等聚合导致的一组十分复杂的疾病. 外因是饮食不当、精神刺激、感染等因素,这些因素能引起胃肠损伤,胃肠损伤则运化失常,导致肝内恶血(坏血或病血)增多,此恶血经由胃时与巴达干结合,在小肠与希日合并最后到达结肠与赫依聚合,使肠功能失调,损伤结肠脉络,使肠粘膜损伤,形成粘膜溃疡而引发此病.“宝如病”病邪久积结肠,使得热毒成“黏”,从而产生溃疡、出血等病理变化,因此,治疗溃疡性结肠炎的关键在于消“黏”解毒,通行赫依,去腐生肌^[3-4].

蒙药嘎日迪散由蒙药野罂粟、阿给组成,是蒙医治疗大肠“宝如病”的主要验方,源自额尔德尼班智达·松巴堪布所著《甘露依法从新》. 该方具有清腹热、消“粘”、消肿痛、止痢的功效,用于治疗“赫依”、“巴达干”病,赤白痢疾、腹痛血痢、胃肠下痢^[5-7]. 本研究利用溃疡性结肠炎动物模型,对嘎日迪散治疗溃疡性结肠炎的药效进行评价.

1 材料

1.1 药物与试剂

嘎日迪散由野罂粟(*Papaver nudicaule* L.)15 g 和阿给(*Artemisia frigid* Wild) 24 g 组成,均购自内蒙古药材采购供应公司,且经中央民族大学中国少数民族传统医学研究院阿里穆斯副教授鉴定. 柳氮磺吡啶肠溶片购于上海信宜天平药业有限公司;补脾益肠丸购于广州陈李济药厂有限公司;三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)和佛氏佐剂购于美国 SIGMA 公司, RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试

收稿日期:2015-01-13;修回日期:2015-06-10.

基金项目:国家自然科学基金(81273872)

第1作者简介:王琳(1979-),女,河南周口人,新乡医学院讲师,中央民族大学在读博士研究生,研究方向:民族医药, E-mail: liansxi@163.com.

通信作者:崔箭(1958-),男,朝鲜族,黑龙江哈尔滨人,中央民族大学教授,博士,研究方向:民族医药, E-mail: cuijian9393@yahoo.com.cn.

剂盒和苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)购于上海碧云天生物技术有限公司;便隐血(OB)试剂购于(台资)珠海贝索生物技术有限公司。

1.2 药材制备及各组给药量的确定

将野罌粟和阿给按照比例称取,然后加22倍量70%乙醇回流提取5h,浓缩提取物至含生药0.70,0.35,0.18 g·mL⁻¹3个浓度,4℃避光保存备用;将柳氮磺吡啶和补脾益肠丸分别研细粉过100目筛用蒸馏水配成含柳氮磺吡啶0.36 g·mL⁻¹和含补脾益肠丸0.16 g·mL⁻¹的混悬液备用。

按照大鼠和人的体表面积比确定大鼠的给药量,即大鼠的给药量(kg·d⁻¹)=0.018×5×人的最大给药量。(d⁻¹),以此为中剂量,中剂量的2倍为高剂量,中剂量的1/2为低剂量。

1.3 实验动物及分组

SPF级新西兰兔子10只,雌雄各半;SPF级Wistar大鼠(200±10)g,雌雄各半,共54只,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(SCXK(京)2012-0001)。动物常规饲养,适应环境一周后,随机分为2组:正常组和溃疡性结肠炎模型组。待模型评价成功后将模型组随机分为6组:模型对照组、嘎日迪低、中、高剂量组(1.76,3.51,7.02 g(kg·d)⁻¹)、柳氮磺吡啶组(3.6 g(kg·d)⁻¹)和补脾益肠丸组(1.62 g(kg·d)⁻¹)。正常组和模型对照组给蒸馏水按照10 mL(kg·d)⁻¹,其它各组按既定的给药量,连续灌胃给药28 d。

1.4 主要仪器

TGL20高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司),IX81型显微镜(日本Olympus公司),JA2003B电子天平(上海越平科学仪器有限公司),UW3100细胞破碎仪(德国Bandelin电子公司),FlexStation3酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

2 方法

2.1 模型制作

用RIPA裂解液提取新西兰兔的结肠蛋白,BCA法测蛋白浓度后,将其与等量的佛氏佐剂充分混匀,即得抗原乳化液。分别于第1 d,第15 d在大鼠足拓和腹股沟处给模型组注射抗原注射液8 mg,正常组注射1.5 mL的生理盐水和佛氏佐剂等体积混合物;第28 d模型组大鼠用TNBS与50%乙醇等体积比混合物,按100 mg·kg⁻¹剂量局部灌肠,正常组用1 mL的25%的乙醇局部灌肠,模型组即可得到典型的溃疡性结肠炎模型。根据大鼠的疾病活动指数(Disease active index,DAI)(表1);大鼠结肠黏膜损伤指数(colon mucosa damage index, CMDI)(表2);大鼠结肠黏膜病理学得分(Histopathological Score HS)(表3),和结肠HE染色的结果来衡量模型制作是否成功。并以此标准来评价蒙药嘎日迪散治疗溃疡性结肠炎药效。

表1 DAI评分标准

体重下降/%	大便性状	大便隐血	记分
0	正常	正常	0
(1~5]	-	+	1
(5~10]	稀便	++	2
(10~15]	-	+++	3
>15	腹泻	++++	4

表2 CMDI评分标准

大体形态表现	症状	评分
取材时与周围组织的关系	无粘连	0
	轻度粘连(结肠与其他组织比较容易剥离)	1
	重度粘连	2
炎症及溃疡形成	无溃疡及炎症	0
	局部充血,无溃疡	1
	1处溃疡不伴充血或肠壁增厚	2
	1处溃疡伴炎症	3
	2处及2处以上溃疡伴炎症	4
	2处以上溃疡和炎症大于1 cm	5
	溃疡和炎症面积大于2 cm,病变范围每增加1 cm,计分加1	6~8分

表3 HS评分标准

类别	分	1分	2分
急性炎症细胞的浸润	无	轻度增加	严重增加
慢性炎症细胞的浸润	无	轻度增加	严重增加
粘膜下水肿	无	斑片状	融合状
上皮细胞坏死	无	局限	弥漫
溃疡形成	无	有	

2.2 标本的采集及结肠炎症的评价

模型制作后第4 d,随机抽取6只正常组和6只模型组大鼠,处死并剪开肠腔,取结肠用冷的生理盐水冲洗肠内容物冲洗干净后用滤纸拭干并平铺于塑料板上,按表2进行观察并予以评分.取各组大鼠结肠病变组织用4%甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋、切片,厚度为5 μm ,然后进行脱蜡和复水及苏木精伊红(HE)染色按表3所列评分标准进行组织病理学损伤评分.治疗结束后,将所有的动物处死按照上述方法取材,并记录相关数据.

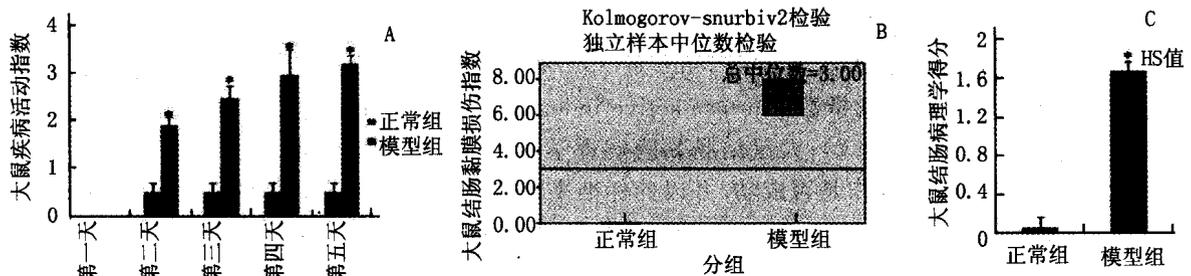
2.3 统计学处理

实验数据以均数士标准差($\bar{x}\pm S$)表示,用SPSS20.0软件进行统计学分析.符合正态分布数据组间差异采用单因素方差分析(ANOVA);不符合正态分布数据组间差异采用非参数检验,显著性标准 $\alpha=0.05$.

3 实验结果

3.1 模型评价

从造模的第二天开始,与正常组相比,模型组大鼠DAI值显著升高,并呈现上升趋势(图1A).模型组的结肠病变比较严重,正常组和模型组相比双侧渐进性检测值为0.002,具有统计学意义(图1B).与正常组相比,模型组HS值显著升高,具有统计学意义(图1C).结果表明从大鼠的DAI值、CMDI值和HS值方面评价模型,模型制作非常成功.



A: 正常组和模型组DAI值; B: 正常组和模型组CMDI值; C: 正常组和模型组HS值; *代表 $P<0.01$

图1 正常组和模型组大鼠的DAI值、CMDI值和HS值

低倍镜下正常组肠壁四层分层比较明显,肠壁的各种结构都比较典型(图2A),而在模型组,低倍镜下肠壁的四层结构还能分得清,但是黏膜层和黏膜下层有大量的炎症细胞存在(图2C).高倍镜下,正常组黏膜层的3层分层比较明显,黏膜上皮、大肠腺、黏膜肌层比较明显(图2B),而模型组中黏膜上皮已经凋亡,大肠腺正在消失,在正在消失的大肠腺周围有大量的急性炎症细胞存在,同时还可以看出有大量的血细胞渗出,溃疡已经形成(图2D).

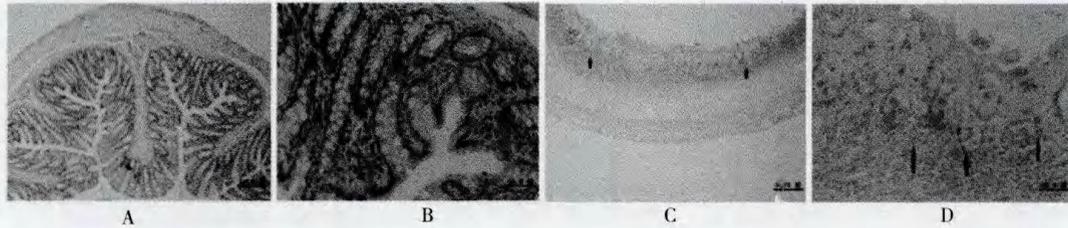
宏观和微观均显示模型制作比较成功,本实验随机抽取的6只大鼠均出现了典型的溃疡,实验模型成功率为100%.

3.2 嘎日迪散治疗 UC 的疗效

3.2.1 DAI值

除正常组外,在最初给药的4 d,各模型组大鼠的DAI值呈现上升的趋势,这符合疾病发展的规律,随着疾病的发展,各组的DAI呈现下降趋势,但是将UC模型组和给药组相比,我们发现给药组的DAI下降趋势

大于模型组。与模型组相比,在给药第4 d 柳氮磺吡啶组 DAI 显著下降;嘎日迪散低、中、高剂量组和柳氮磺吡啶组在给药的第7 d 开始显著降低,这说明各给药组大鼠的 DAI 值下降并不是模型自愈引起的,而是药物在起作用。从下降趋势上看柳氮磺吡啶的药效要比其他各组快,但是其他各组从长远疗效上不亚于柳氮磺吡啶,而嘎日迪散各剂量组和补脾益肠丸组药效一致(图3)。



A: 正常组, 肠壁结构完整; B: 正常组, 结肠粘膜形态规则; C: 模型组, 粘膜层和粘膜下层有大量的炎细胞浸润; D: 模型组, 腺体结构破坏, 溃疡形成。

图2 正常组和模型组大鼠结肠粘膜病理形态

3.2.2 CMDI 和 HS

药物治疗后经非参检验 CMDI 值的双侧渐进性检测值为 0.007, 小于 0.05(图 4A); HS 值的双侧渐进性检测值为 0.019, 小于 0.05(图 4B), 都具有统计学意义, 说明各组药物都有疗效。

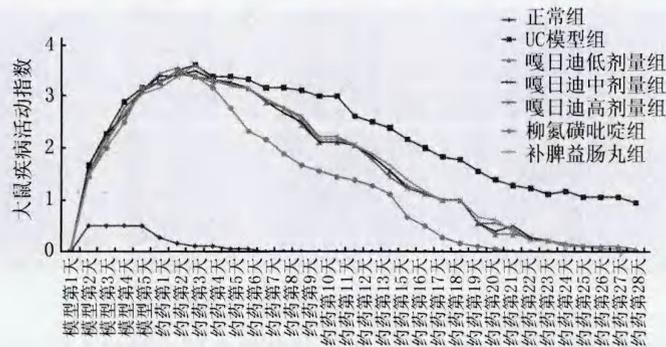


图3 药物干预前后大鼠DAI的变化

3.2.3 病理学形态变化

从图 5 可知, 模型组还有典型的溃疡存在, 黏膜肌层不连续; 其他各组黏膜上皮完整, 黏膜肌层连续, 黏膜层的结构完整, 但在黏膜固有层和黏膜下层中仍可见炎症细胞的浸润, 甚至淋巴小结的存在, 这说明在药物的干预下 UC 大鼠结肠黏膜的结构恢复正常了, 但黏膜固有层的慢性炎细胞还没完全消除。各给药组与正常组相比黏膜层的结构都很完整, 但在各给药组的黏膜固有层和黏膜下层中慢性炎症细胞的数量明显多于正常组, 说明在药物的干预下, 炎症尚未完全消除。

4 讨论

本研究模型制作采用的是复合法, 即免疫法加 TNBS 诱导法, 该法制作的模型和人类发病比较相似, 而且病程较长, 常被用于新药的研发和中药药理研究^[8]。本实验表明 UC 模型组在整个实验周期中均存在典型的溃疡。

现代治疗 UC 多采用 5-氨基水杨酸、类固醇类激素合并一些免疫调节抑制剂如(咪唑硫嘌呤和 6-巯嘌呤)联合使用, 虽然有一定的效果, 但是同时具有腹泻、腹部绞痛、腹痛伴发烧和高血压等严重的副作用^[9]。嘎日迪散是蒙医中治疗“肠宝如病”常用的验方, 其中的野罌粟归大肠经, 具有镇咳、镇痛、止泻和抗过敏作用, 本实验室的前期研究表明: 野罌粟可以通过降低大鼠肠内环磷酸腺苷(cAMP)的浓度、升高大鼠肠内环磷酸鸟苷(cGMP)的浓度以及降低二者的比例而达到抗腹泻的作用, 此外野罌粟在治疗慢性腹泻时还能明

显降低小肠推进率,迅速缓解甚至消除腹泻及伴随症状——腹痛,野罂粟的有效成分为脂溶性的生物碱部分PN2、PN3,其作用靶点为结肠黏膜^[10-13];阿给具有止血、消肿、消“奇哈”之功效,其有效成分主要是黄酮类物质,能止血促凝,修复胃肠道黏膜损伤^[14-18]。二者合并,具有疏肝除浊,清除腑热、消“黏”解毒、通行赫依、祛腐生肌之功效。

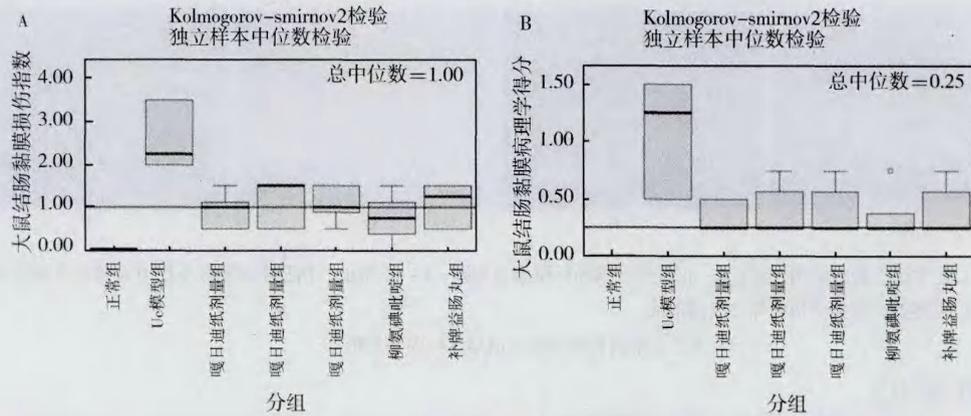


图4 药物治疗后各组CMDI值和HS值

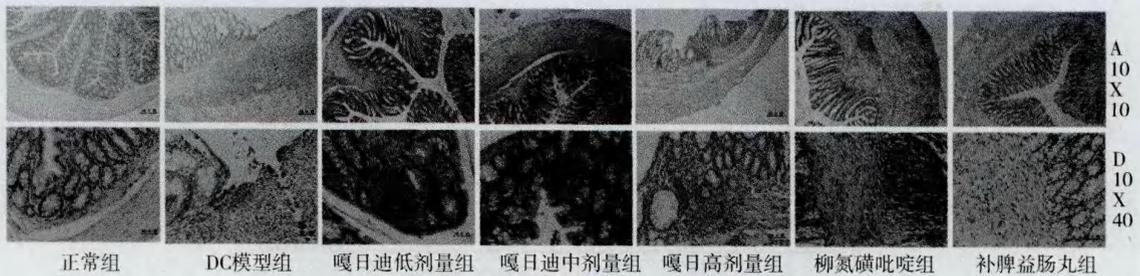


图5 药物干预后各组结肠黏膜HE染色结果

临床研究证实,嘎日迪散在治疗溃疡性结肠炎时可明显修复肠道黏膜损伤,有效提高治疗效果,降低患者的痛苦和病情复发率,改善溃疡性结肠炎的伴随症状,提高患者生活质量等特^[2,19]。我们前期实验研究发现嘎日迪能有效降低肠道细菌异位率、血清内毒素、血清丙二醛含量,升高血清还原型谷胱甘肽、超氧化物歧化酶活性,具备良好的抗氧化、抵抗肠黏膜局部自由基损伤、降低黏膜上皮细胞的死亡率、减少溃疡面以及改善肠黏膜局部缺血、提高血管的通透性等作用^[3];本研究从模型动物层面证实嘎日迪散能有效修复 UC 大鼠受损黏膜,其疗效和阳性药柳氮磺吡啶及补脾益肠丸相当,为进一步研究嘎日迪散的药效学机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Ordas I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2012, 380(9853):1606-1619.
- [2] 王海英. 蒙药嘎日迪散治疗溃疡性结肠炎 90 例疗效评价[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(15):11-12.
- [3] 崔 箭, 裴凌鹏, 庞宗然, 等. 蒙药嘎日迪对大鼠肠黏膜屏障功能修复的实验研究[J]. 中国民族医药杂志, 2012(2):45-47.
- [4] 敖 奇. 蒙药奥奇溃结宁灌肠治疗溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(1):15-16.
- [5] 朱 丹, 裴玲燕, 崔 箭. 蒙药嘎日迪-2 药学研究进展[J]. 中央民族大学学报:自然科学版, 2013(04):63-68.
- [6] 裴玲燕, 崔 箭, 刘伟志, 等. 正交试验法优选蒙古族药嘎日迪散有效部位提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 21:31-34.
- [7] 崔 箭, 刘同祥, 吴 倩. 蒙药嘎日迪-2 化学成分研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2012, 34(3):272-274.
- [8] 连大卫. 肠炎清对溃疡性结肠炎模型大鼠的治疗机制研究[D]. 广州:暨南大学, 2013.
- [9] Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF-kappaB signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis[J]. IntImmunopharmacol, 2013, 17(3):907-916.
- [10] 刘伟志, 钟伯雄, 裴玲燕, 等. 蒙药野罂粟对腹泻大鼠脏器 AC、cAMP、cGMP 含量影响的实验研究[J]. 中央民族大学学报:自然科学版, 2014(02):55-59.

- [11] 崔箭,庞宗然,崔勋.野罂粟化学成分及药理作用研究进展[J].河北医学,2003(6):553-555.
- [12] 钟伯雄.野罂粟涩肠止泻与归大肠经的在体实验研究[D].北京:中央民族大学,2012.
- [13] 崔箭,崔勋.野罂粟胶囊治疗慢性腹泻60例临床疗效观察[J].天津中医药,2004(4):290-291.
- [14] 刘伟志.蒙药阿给炭促进胃溃疡出血创面愈合改善粘膜下组织修复状态的机制研究[D].北京:中央民族大学,2013.
- [15] 钟伯雄,张婉,刘伟志,等.蒙药阿给炭前后的止血作用及其机制研究[J].中药材,2011(6):872-876.
- [16] 崔箭,唐丽,蓝蓉,等.蒙药阿给炭治疗支气管扩张咯血临床观察[J].中央民族大学学报:自然科学版,2006(2):149-151.
- [17] 刘伟志,张婉,钟伯雄,等.蒙药阿给(小白蒿)炒炭前后止血作用的实验研究[J].中华中医药杂志,2010,12:2282-2284.
- [18] 楼彩霞.蒙药阿给炭止血作用及其机制研究[D].北京:中央民族大学,2010.
- [19] 崔箭,庞宗然,德利格玛,等.嘎日迪散治疗溃疡性结肠炎60例临床观察[J].天津中医药,2012,29(1):17-18.

Role of Mongolian Medicine Garidisan on Rat Ulcerative Colitis

WANG Lin^{1,2}, PEI Lingyan¹, LI Shucun¹, CUI Jian¹

(1. Key Lab of Minority Traditional Medicine, State Nationalities Affairs Commission and Ministry of Education, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 2. Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective: To investigate the treatment effect of garidisan on rat ulcerative colitis. Methods: The rat model of ulcerative colitis is induced by immune method and TNBS. From the macrography and microscopic evaluation identified the pharmacodynamics of garidisan on rats ulcerative colitis. Results: Animal disease activity index, the colon mucosal damage index, histopathological score of treatment group showed statistical significance comparing with model group. The results of HE showed that there were still typical ulcer in model group, other treatment group mucosal repaired well. Conclusion: The garidisan can effectively cure the rat ulcerative colitis. its role is identical with positive drug sulfasalazine and Bupiyichang.

Keywords: mongolian medicine garidisan; ulcerative colitis; Papaver nudicaule L; Artemisia frigid Wild

(上接第93页)

- [11] EDZWALD J K. Coagulation in drinking water treatment: particles, organics and coagulants[J]. Water Science and Technology, 1993, 27(11):21-35.
- [12] 陈伟仲.高锰酸盐复合剂与氯胺联合预氧化强化低温低浊水处理[D].北京:北京工业大学,2004.
- [13] 李圭白,杨艳玲,马军,等.高锰酸钾去除天然水中微量有机污染物机理探讨[J].大连铁道学院学报,1998,19(2):1-4.
- [14] 陈杰,李圭白,杨威,等.氯胺的氧化助凝助滤效能[J].水处理技术,2006,32(12):24-26.

Organic Pollutants Removal in Raw Water by a New Type Pre-oxidation Process

CHEN Weizhong¹, LI Xing²

(1. China Petroleum Pipeline Engineering Corporation Municipal Engineering Department, Langfang 065000, China; 2. College of Civil Engineering and Architecture, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract: A new type pre-oxidation process enhanced conventional filtration, several indexes of the filtered water are measured and compared with conventional filtered water. The result shows that the content of macromolecular organic pollutants, peak area and kinds of organic substances, total content of organic pollutants of filtered water of new pre-oxidation process are decreased by 8.6%, 37%, 17.8%, 13.86% respectively. Chemical security of filtered water is further enhanced.

Keywords: pre-oxidation; organic pollutants; GC/MS; peak area