

· 药理研究 ·

黄蜀葵花提取物对小鼠 IBD 的治疗作用及 TNF- α 、IFN- γ 表达的影响

程滢瑞^{1,2}, 陈玉根¹, 周锦勇¹, 曲丁好², 周正璇², 杨柏霖¹, 王琮^{1*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029)

摘要: **目的** 探讨黄蜀葵花提取物对炎症性肠病(IBD)的治疗作用及其可能机制。 **方法** BABL/c 小鼠 80 只, 随机分为正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶组和黄葵提取物组, 每组 20 只, 后 3 组用 TNBS 诱导建立小鼠 IBD 模型。造模开始时, 柳氮磺吡啶组和黄葵提取物组分别给予 0.5 g/kg 柳氮磺吡啶, 3.75 g/kg 黄蜀葵花提取物灌胃, 每日 1 次, 连续 28 d。实验终点时分析实验动物的存活率、结肠质量长度比值、结肠组织病理变化, 以及结肠组织中细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 含量。 **结果** 正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶组和黄葵提取物组动物存活率分别为 100%、40%、60% 和 75%, 黄葵提取物组小鼠存活率显著增高, 与模型组相比差异有统计学显著意义($P < 0.05$)。与模型组相比, 黄葵提取物组结肠质量长度比值显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 结肠组织炎症和隐窝损害显著减轻, 病理评分亦显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 结肠组织 TNF- α 、IFN- γ 含量明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。 **结论** 黄蜀葵花提取物能够抑制 IBD 模型小鼠肠道炎症, 提高模型动物生存率, 抑制 TNF- α 和 IFN- γ 等炎症因子表达可能是其作用机制之一。

关键词: 黄蜀葵花提取物; 炎症性肠病; TNF- α ; IFN- γ **中图分类号:** R285.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-0482(2015)01-0032-03**DOI:** 10.14148/j.issn.1672-0482.2015.0032

Effects of *Abelmoschi Corolla* Extracts on IBD Treatment in Mice and Expression of TNF- α and IFN- γ

CHENG Ying-rui^{1,2}, CHEN Yu-gen¹, ZHOU Jin-yong¹, QU Ding-hao², ZHOU Zheng-xuan², YANG Bo-lin¹, WANG Qiong^{1*}

(1. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 2. The First Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the therapeutic effect of *Abelmoschi corolla* extracts (ACE) on inflammatory bowel disease (IBD) and its possible mechanism. **METHODS** 80 BABL/c mice were randomly divided into the control group, model group, sulfasalazine group and ACE group, 20 mice in each group. IBD models were established by the induction of TNBS in all groups, except the normal control group. Then, sulfasalazine group and ACE group were administered with 0.5 g/kg sulfasalazine and 3.75 g/kg *Abelmoschi corolla* extracts respectively, by oral gavage once a day for 28 d. The animal survival rates, the colon weight/length ratios, the tissue pathology of colon, and the contents of tumor necrosis factor (TNF- α) and γ -interferon (IFN- γ) in colon tissue were analyzed at the end of experiments. **RESULTS** The animal survival rates of normal control group, model group, sulfasalazine group and ACE group were 100%, 40%, 60% and 75% respectively. Compared to the model group, the survival rates of mice in ACE group increased significantly, the colon weight/length ratios decreased, pathological scores with notable alleviation of microscopic signs reduced and the contents of cytokines TNF- α and IFN- γ in colon tissue decreased, with statistically significant differences ($P < 0.05 \sim 0.01$). **CONCLUSION** *Abelmoschi corolla* extracts can attenuate intestinal inflammation in IBD mice models and improve the animal survival rates. One of the mechanisms is possibly associated with the inhibition of TNF- α , IFN- γ and other inflammatory cytokines.

KEY WORDS: *Abelmoschi corolla* extracts; inflammatory bowel disease; TNF- α ; IFN- γ

炎症性肠病(IBD)是一种病因尚不明确的慢性非特异性肠道炎症性病变, 包括溃疡性结肠炎(UC)

和克罗恩病(CD)。近年来, 在 IBD 高发病的发达国家或地区其发病率持续在高水平状态, 并且在 IBD

收稿日期: 2014-10-19; **修稿日期:** 2014-12-18**基金项目:** 江苏高校优势学科建设工程项目; 江苏省临床医学中心(BL2014100); 南京市科技发展指导性计划(2013YX008); 江苏省普通高校研究生科研创新计划(SJLX_0429)**作者简介:** 程滢瑞(1989—), 女, 河南周口人, 南京中医药大学 2012 级硕士研究生。* 通信作者: calcspar@163.com

低发病的发展中国家或地区呈上升趋势^[1]。大部分 IBD 患者需终生治疗,而临床主要治疗药物如糖皮质激素、氨基水杨酸、免疫抑制剂和抗肿瘤坏死因子抗体副作用较多,多数患者不能长期坚持治疗,导致疾病复发和进展。因此,开发安全有效的 IBD 新药具有重要意义。

黄蜀葵花为黄蜀葵的干燥花,始载于《嘉祐本草》,具有消痈肿、清热利湿、消炎解毒等功效。我院对黄蜀葵花的系统研究已有 40 余年历史,成功开发了黄葵胶囊、疮灵液等新药和制剂,用于治疗慢性肾病和疮疡,效果确切^[2]。我们临床的实践发现,IBD 作为“内疡”,应用黄蜀葵花同样有效。本研究通过应用黄蜀葵花提取物干预 IBD 模型小鼠,探讨黄蜀葵花治疗 IBD 的作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验用药物及试剂

黄蜀葵花提取物由南京中医药大学附属医院制剂部提供;三硝基苯磺酸(Picrylsulfonic acid solution, TNBS, Sigma, SLBD6811V);柳氮磺吡啶(上海中西三维药业有限公司,批号:20130307);小鼠 TNF- α 和 IFN- γ ELISA 试剂盒(美国 R&D,批号:20140321XE、20140320SD)。

1.2 实验动物造模及分组

BABL/c 小鼠 80 只,18~22 g,雌雄各半,购自扬州大学比较医学中心(SCXK(苏)2012-0004)。随机分为正常对照组、模型组、柳氮磺吡啶组和黄葵提取物组,每组 20 只。

正常对照组不造模,正常饲养。模型组、柳氮磺吡啶组和黄葵提取物组参照文献^[3]方法,利用 TNBS 诱导建立小鼠 IBD 模型。小鼠于实验前剃毛,皮肤外涂 TNBS 3.75 mg(48%乙醇溶解),分别于外涂 TNBS 后的第 7 天、第 14 天、第 21 天直肠给予 TNBS 0.75、1.5、2.25 mg(40%乙醇溶解),具体造模方案见图 1。

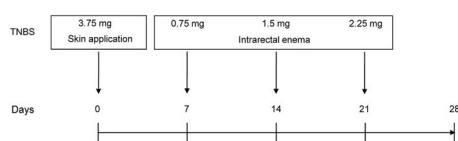


图 1 TNBS 诱导 IBD 小鼠模型造模方案

1.3 药物干预与观察指标

黄蜀葵花根据临床病人用量换算成小鼠用量黄蜀葵花和柳氮磺吡啶分别为 3.75 g/kg 和 0.5 g/kg,灌胃给药。

药物干预与造模同时进行。黄蜀葵花组给予 3.75 g/kg 黄蜀葵花提取物,柳氮磺吡啶组给予 0.5 g/kg 柳氮磺吡啶,正常对照组和模型组给予等量生理盐水,每日 1 次,连续灌胃给药 28 d。

每日记录小鼠体质量和死亡情况。实验结束时处死小鼠,取血。取结直肠称质量,测量长度和厚度。距肛门 5、10、15 cm 分别取结直肠组织进行结肠炎症病理评分和组织炎症细胞因子含量检测。10%福尔马林固定,常规取材,脱水,石蜡包埋,切片经 HE 染色,光学显微镜观察,并根据文献^[4]进行结肠炎症病理评分。将小鼠结肠组织制成 10%组织匀浆,参照试剂盒说明书,检测细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 含量;采用 BCA 试剂盒测定组织匀浆中蛋白含量,结果以 pg/mg 表示。

1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析,计数资料用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本统计分析采用组间 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄蜀葵花提取物对 TNBS 诱导的 IBD 小鼠存活率的影响

结果见表 1。正常对照小鼠实验过程中未出现死亡,存活率为 100%;模型组小鼠,28 d 动物存活率为 40%,经 χ^2 检验,与正常对照组比较具有显著性差异($P < 0.01$);柳氮磺吡啶组 28 d 动物存活率为 60%,与模型组比较尚无显著性差异;黄蜀葵花提取物组 28 d 动物存活率为 75%,与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);黄葵提取物组与柳氮磺吡啶组比较,差异未见统计学意义($\chi^2 = 1.026$, $P = 0.31$)。提示黄蜀葵花提取物能提高 TNBS 诱导的 IBD 模型小鼠的存活率。

2.2 黄蜀葵花提取物对 TNBS 诱导的慢性结肠炎小鼠结肠质量长度比值的影响

结果见表 2。TNBS 诱导的慢性结肠炎小鼠结肠重量/长度的比值升高,与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.01$);柳氮磺吡啶和黄葵提取物均能显著降低模型组小鼠升高的结肠重量/长度比值($P < 0.05 \sim 0.01$)。提示黄葵提取物能改善 TNBS 诱导的 IBD 模型小鼠结直肠炎症水肿。

2.3 黄蜀葵花提取物对 TNBS 诱导的 IBD 小鼠结肠影响的病理分析

结果见图 2,表 3。

表 1 黄蜀葵花提取物对 TNBS 诱导的 IBD 小鼠存活率的影响

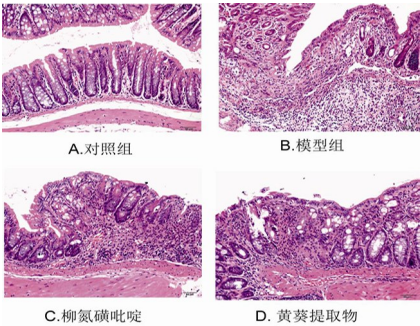
分组	n	死亡数量/只				终点生存率/%
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	
对照组	20	0	0	0	0	100
模型组	20	6	2	2	2	40 ^{##}
柳氮磺吡啶组	20	6	2	0	0	60
黄葵提取物组	20	4	1	0	0	75 [*]

注:与正常对照组比较, $\chi^2=17.143$, $##P<0.01$;与模型组比较, $\chi^2=5.013$, $*P<0.05$ 。

表 2 黄蜀葵花提取物对 TNBS 诱导的慢性结肠炎小鼠结肠质量长度比值的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	结肠质量长度比值/(mg · cm ⁻¹)
对照组	31.63 ± 0.82
TNBS 模型组	41.26 ± 4.10 ^{##}
柳氮磺吡啶组	36.07 ± 3.49 [*]
黄葵提取物组	31.01 ± 4.95 ^{**}

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



注:HE 染色, $\times 200$ 。

图 2 黄蜀葵花提取物对 TNBS 诱导的 IBD 小鼠结肠影响的病理分析

表 3 黄蜀葵花提取物对 TNBS 诱导的 IBD 小鼠结肠炎症病理评分的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	结肠炎症病理评分
对照组	0.67 ± 0.36
TNBS 模型组	9.88 ± 2.63 ^{##}
柳氮磺吡啶组	3.63 ± 0.42 [*]
黄葵提取物组	3.57 ± 0.76 [*]

注:与模型组比较, $*P<0.05$;与正常对照组比较, $##P<0.05$ 。

如图 1 所示,正常对照组(图 1A)小鼠结肠未见明显病变;模型组(图 1B)小鼠结肠炎症严重程度为轻度或中度,多数累及黏膜层和黏膜下层,个别的累及肌层,局部见隐窝损害。柳氮磺吡啶组(图 1C)结肠炎症严重程度较模型组明显减轻,病变均局限于黏膜层,无隐窝损害;黄蜀葵花提取物组(图 1D)结肠炎症较模型组明显减轻,病变均局限于黏膜层,无隐窝损害。

病理评分结果(表 3)表明, TNBS 诱导的 IBD 小鼠病理评分升高,与正常对照组比较具有显著性差异($P<0.05$);柳氮磺吡啶与黄葵提取物病理评分明显降低,与模型组比较具有显著性差异($P<0.05$),黄葵提取物组与柳氮磺吡啶组比较无显著性差异。提示黄葵提取物能显著改善 TNBS 对结肠的组织损害,其改善 TNBS 对结肠的组织损害作用与柳氮磺吡啶相当。

2.4 黄蜀葵花提取物对模型动物结肠组织 TNF- α 、IFN- γ 含量的影响

结果见表 4。

表 4 黄蜀葵花提取物对结肠组织中 TNF- α 、IFN- γ 的影响($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}, n=8$)

组别	TNF- α	IFN- γ
对照组	190.2 ± 29.4	263.7 ± 80.4
TNBS 模型组	328.2 ± 69.2 ^{##}	549.6 ± 149.0 ^{##}
柳氮磺吡啶组(0.5 g/kg)	210.8 ± 38.3 ^{**}	325.7 ± 97.8 ^{**}
黄葵提取物组(3.75 g/kg)	186.6 ± 38.8 ^{**}	295.5 ± 121.8 ^{**}

注:与正常对照组比较, $##P<0.01$;与模型组比较, $**P<0.01$ 。

如表 4 所示,模型组小鼠结肠组织中 TNF- α 和 IFN- γ 含量显著升高,与正常对照组比较具有显著性差异($P<0.01$)。黄葵提取物和柳氮磺吡啶均能显著降低模型组小鼠升高的 TNF- α 和 IFN- γ 含量($P<0.01$),黄葵提取物组与柳氮磺吡啶组比较无显著性差异。提示黄葵提取物能显著抑制模型组小鼠升高的炎症因子 TNF- α 和 IFN- γ 。

3 讨论

研究表明 IBD 发病率在全球呈上升趋势,尤其亚洲等传统上的低流行地区 IBD 发病明显增加^[5]。如何在 IBD 治疗中发挥中医药特色与优势,值得深入探讨。

TNBS 诱导的结肠炎动物模型是一种免疫介导的肠道炎症模型,经常用来评价新药及进行 IBD 治疗药物的作用机制研究^[3]。其机制(下转 73 页)