

· 论著 ·

黄连水煎液对实验性大鼠溃疡性结肠炎治疗作用的研究

武涛¹, 相芳², 刘静³ (1. 南京军区南京药品器材供应站, 江苏南京 210003; 2. 解放军 81 医院药剂科, 江苏南京 210002; 3. 解放军 454 医院药剂科, 江苏南京 210002)

[摘要] **目的** 探寻黄连水煎液对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用。**方法** 大鼠以二甲胍(DMH) 40 mg/kg 皮下注射+3% 葡聚糖硫酸钠(DSS)水溶液饮用诱导形成大鼠溃疡性结肠炎模型, 给予黄连水煎液灌胃治疗 5 周, 观察黄连水煎液对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用。**结果** 与模型组相比, 黄连水煎液各剂量组能够不同程度改善溃疡性结肠炎引起的大鼠体重增长过慢($P<0.05$, $P<0.01$)。实验第 10 周各组大鼠结肠均有畸变隐窝灶(ACF)形成, 黄连水煎液各剂量组形成 ACF 的平均数量明显低于模型组($P<0.01$)。病理检查结果显示, 模型组大鼠可见结肠组织出现了比较严重的非典型增生, 腺体排列紊乱, 细胞层次明显增多且拥挤, 黏液分泌显著减少, 黏膜上皮脱落, 糜烂重, 溃疡多且大, 黏膜严重充血、水肿; 采用黄连水煎液各剂量组的大鼠上述现象则有所改善, 但出现了不同程度的细胞拥挤, 核增大和复层。透射电镜结果显示, 模型组大鼠出现上皮细胞核染色质聚集, 细胞表面微绒毛排列紊乱、断裂现象, 黄连水煎液各剂量组的大鼠绒毛排列稀疏, 未见断裂。**结论** 黄连水煎液对大鼠溃疡性结肠炎有显著的治疗作用。

[关键词] 黄连水煎液; 溃疡性结肠炎; 大鼠

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)01-0028-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.008

Effect of essential coptis decoction on rats with experimental ulcerative colitis

WU Tao¹, XIANG Fang², LIU Jing³ (1. Nanjing Pharmaceutical and Equipment Plant of Nanjing Military Region, Nanjing 210003, China; 2. Department of Pharmacy, No. 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China; 3. Department of Pharmacy, No. 454 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of coptis decoction on rats with ulcerative colitis. **Methods** Rat ulcerative colitis model was induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) (40 mg/kg s.c.) + 3% dextran sodium sulfate solution (DSS) (freely drinking). The drugs were given orally once a day for 7 day per week. After 5 weeks, the body weight, the number of colon ACFs and the number of colon cancer in rats, as well as the morphological changes of rat colon tissues were evaluated. **Results** Coptis decoction significantly improved the dyscrasia induced by DMH + DSS, the both of body weight and general condition were better than those of control group ($P<0.05$, $P<0.01$). Coptis decoction also significantly inhibited ACF in the rats treated by DMH + DSS for 10 weeks ($P<0.01$). The model group showed typical inflamed mucosa, a nearly complete subversion of the normal surface architecture. Compared with the model group, coptis decoction in each dosage group could improve rat atypical hyperplasia, mucosal hyperemia, edema and cells in the crowded. Transmission electron microscope showed that, in epithelial nuclei chromatin aggregation in the model group, the cell surface microvilli arranged disorder, fault phenomenon. Compared with model group, the coptis decoction had improved significantly. **Conclusion** Coptis decoction had significant therapeutic effect on rat ulcerative colitis.

[Key words] coptis decoction; ulcerative colitis; rats

溃疡性结肠炎是一种常见疾病, 严重威胁人类的健康。近年来其发病率在全球大部分地区及我国均有明显上升趋势^[1,2]。因此, 如何防治溃疡性结

肠炎是当前医药界的一项重要课题。黄连在我国作为消化道疾病用药已有 3 000 余年历史, 主要有效成分为小檗碱, 抑制多种实验性炎症, 抗炎机制与刺激促皮质激素释放有关, 临床用于胃肠道细菌感染的治疗。为此, 笔者以二甲胍(1,2-dimethylhydrazine, DMH) 40mg/kg 皮下注射加 3% 葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)水溶液饮用诱导大鼠产生溃疡性结肠炎^[3-5], 研究了小檗碱

[作者简介] 武涛, 主管药师。研究方向: 药品器材保障。E-mail: sh_hzk@yeah.net

[通讯作者] 刘静, 主管药师。研究方向: 临床药学。Tel: (025) 80865138; E-mail: 455379546@qq.com

对溃疡性结肠炎产生的干预作用及其与畸变隐窝灶(aberrant crypt foci, ACF)的可能关系,为其在临床应用进一步提供科研依据。

1 材料

1.1 仪器 日立 H-600 透射电子显微镜(日本日立公司);KD-BM 型包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);RM2016 型切片机(上海徕卡仪器有限公司);DM11 型 Leica 倒置显微镜[徕卡显微系统(上海)贸易有限公司]。

1.2 试药 黄连水煎液(浓缩为浓度 1 g/ml,解放军 454 医院制剂室);柳氮磺胺嘧啶肠溶片(上海福达制药有限公司,批号:22140205)。工具药:二甲胍(1,2-dimethylhydrazine, DMH, CAS:306-37-6,常州千杏生物科技有限公司);葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS,上海生工生物)。

1.3 实验动物 SD 大鼠,60 只,雄性,160~180 g,SPF 级,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016。

2 方法

2.1 造模及给药 SD 大鼠 60 只,体重 160~180 g,雄性,在相对温度 22~24 °C、相对湿度 40%~60% 的实验室内饲养,光照时间随自然变化,供给常规颗粒饲料和自来水,自由饮食饮水。大鼠适应性喂养 1 周,依据体重将大鼠随机分为正常对照组、模型组、黄连水煎液低、中、高剂量(0.25、0.5、1 g/kg,1 ml/100 g 大鼠体质量)组和阳性柳氮磺胺嘧啶片(0.3 g/kg,1 ml/100 g 大鼠体质量)组,共 6 组,每组 10 只。大鼠造模具体步骤如下:实验第 1 周除正常对照组外所有大鼠给予 DMH 40 mg/kg 颈部皮下注射,隔天 1 次,共 3 次;第 2 周除正常对照

组外所有大鼠自由饮用 3% DSS 水溶液;第 3、4 周所有大鼠自由饮用自来水和摄食普通饲料。从第 5 周开始,除模型组外各组大鼠分别灌胃给药,给药 5 周,于实验第 10 周各组大鼠用 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g 大鼠体质量)腹腔麻醉,取结肠组织观察各组大鼠结肠情况^[6-8]。

2.2 一般情况和体重 每日上、下午分别观察 1 次各组大鼠的一般情况,如毛色、食量、大便性状、精神活动情况等,每周称 1 次体质量。

2.3 大鼠结肠畸变隐窝灶(ACF)计数 取大鼠部分结肠,去脂肪组织,沿肠系膜附着物纵向剖开整个肠道,冰生理盐水冲洗干净,平铺于塑料板上,10% 甲醛固定 4~6 h 后,用 2 g/L 亚甲蓝浸泡 30 s,40 倍光学显微镜下计数 ACF 个数。

2.4 大鼠结肠电镜检查 一部分结肠切成 0.5 mm³ 大小组织,用 4% 多聚甲醛-0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.3~7.4)固定保存,行透射电镜检查。

2.5 大鼠结肠病理检查 剩余结肠标本用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,常规切片和 HE 染色,进行病理学检查。

2.6 统计学方法 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS17.0 统计软件处理,用 ANOVA 方差分析进行差异显著性检验。

3 结果

3.1 黄连水煎液对溃疡性结肠炎大鼠体质量的影响 见表 1,造模 3 周开始,模型组大鼠和正常对照组大鼠体质量开始出现差异($P < 0.05$),从第 5 周开始,体质量出现显著性差异($P < 0.01$)。与模型组相比,黄连水煎液各剂量组和柳氮磺胺嘧啶片组均能不同程度地增加溃疡性结肠炎所致的大鼠体质量。

表 1 黄连水煎液对溃疡性结肠炎大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

实验时间	组别					
	正常对照组	模型组	柳氮磺胺嘧啶片组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
造模前	167.80±7.67	167.80±10.37	167.80±10.04	167.80±10.84	166.60±6.57	166.80±8.24
造模 1 周	249.10±17.67	226.50±32.47	227.20±9.78	220.40±8.90	208.00±1.74	220.60±14.52
造模 2 周	291.80±29.20	270.00±34.16	272.30±10.53	265.20±15.16	266.90±13.89	274.10±18.48
造模 3 周	354.50±31.03	320.40±38.94 [#]	315.50±17.84	306.60±18.12	306.90±17.09	311.70±22.85
造模 4 周	383.10±29.81	340.70±42.05 [#]	342.70±3.07	330.60±22.93	332.00±19.14	339.00±27.04
造模 5 周	411.60±31.83	345.90±44.21 [#]	375.60±26.21	361.10±24.26	364.50±20.66	370.90±32.50
造模 6 周	432.70±32.19	355.60±48.77 [#]	400.00±30.61	380.70±28.25	381.40±21.46	393.50±33.41 [*]
造模 7 周	451.60±32.02	366.60±53.64 [#]	411.30±33.24	398.90±34.94	399.20±23.88	413.70±36.18 [*]
造模 8 周	465.80±34.61	372.30±19.13 [#]	432.30±34.92	409.20±34.49 ^{**}	418.70±25.56 ^{**}	431.40±38.82 ^{**}
造模 9 周	463.70±51.53	386.60±53.64 [#]	431.30±38.98	415.30±39.02	423.50±30.35	435.60±38.88 ^{**}
造模 10 周	479.20±59.66	388.30±52.29 [#]	435.80±52.52	417.60±50.43	431.80±30.71 [*]	435.60±51.37 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与模型组比较;[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$,与正常对照组比较

量增长过慢($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.2 黄连水煎液对溃疡性结肠炎大鼠 ACF 的影响 实验第 10 周各组大鼠结肠均有 ACF 形成, 模型组形成 ACF 的平均数量多于黄连水煎液各剂量组和柳氮磺胺嘧啶片组, 说明各药物干预组能够明显降低 ACF 数量 ($P<0.01$)。结果见表 2。

3.3 黄连水煎液对溃疡性结肠炎大鼠组织形态的

表 2 黄连水煎液对溃疡性结肠炎大鼠 ACF 数量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	给药剂量(g/kg)	ACF 数目(个)
正常对照组	...	0
模型组	...	29.80±6.70
柳氮磺胺嘧啶片组	0.3	18.60±3.37**
低剂量组	0.25	21.70±4.62**
中剂量组	0.5	20.00±4.92**
高剂量组	1	17.30±5.10**

** $P<0.01$, 与模型组比较

影响 病理检查结果显示, 模型组大鼠可见结肠组织出现了比较严重的不典型增生, 腺体排列紊乱, 细胞层次明显增多且拥挤, 黏液分泌显著减少, 黏膜上皮脱落, 糜烂重, 溃疡多而且大, 黏膜严重充血、水肿; 黄连水煎液各剂量组和柳氮磺胺嘧啶片组上述现象则有所改善, 但出现了不同程度的细胞拥挤, 核增大和复层。透射电镜结果显示, 模型组大鼠出现上皮细胞核染色质聚集, 细胞表面微绒毛排列紊乱、断裂现象; 黄连水煎液各剂量组和柳氮磺胺嘧啶片组微绒毛排列稀疏, 未见断裂。见图 1、图 2。

4 讨论

溃疡性结肠炎的主要症状为腹痛、腹泻、恶心、呕吐、发热; 起病急骤, 全身症状有发热、食欲不振。局部症状有肛门内胀热灼痛、便意频繁、粪便混有黏液及血丝、里急后重、排尿不畅、尿频, 由于其发病周期长, 给患者、家庭及社会造成很大负担。

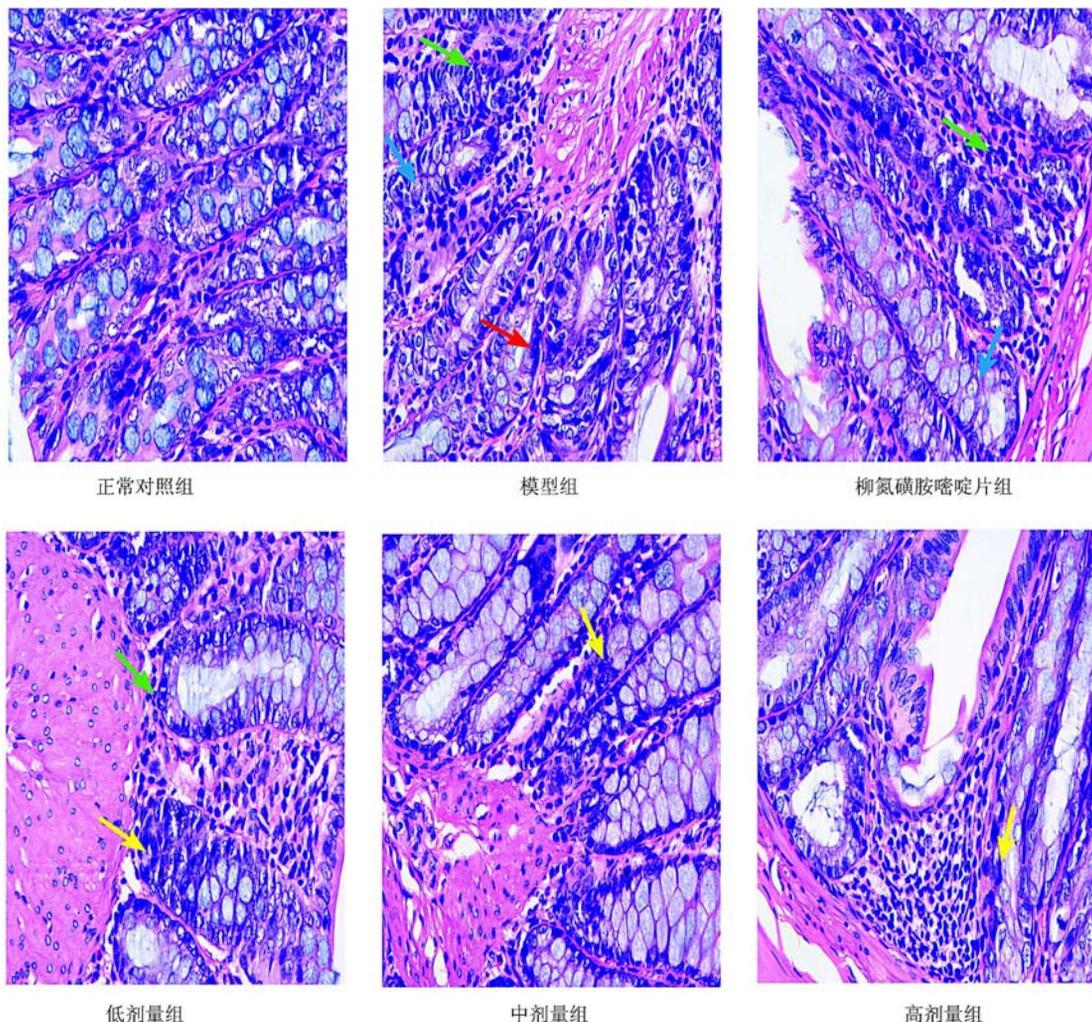


图 1 溃疡性结肠炎大鼠结肠组织形态病理检查(HE, $\times 400$)

→ 中性粒细胞(炎症浸润); → 不典型增生; → 细胞层次增多; → 核增大

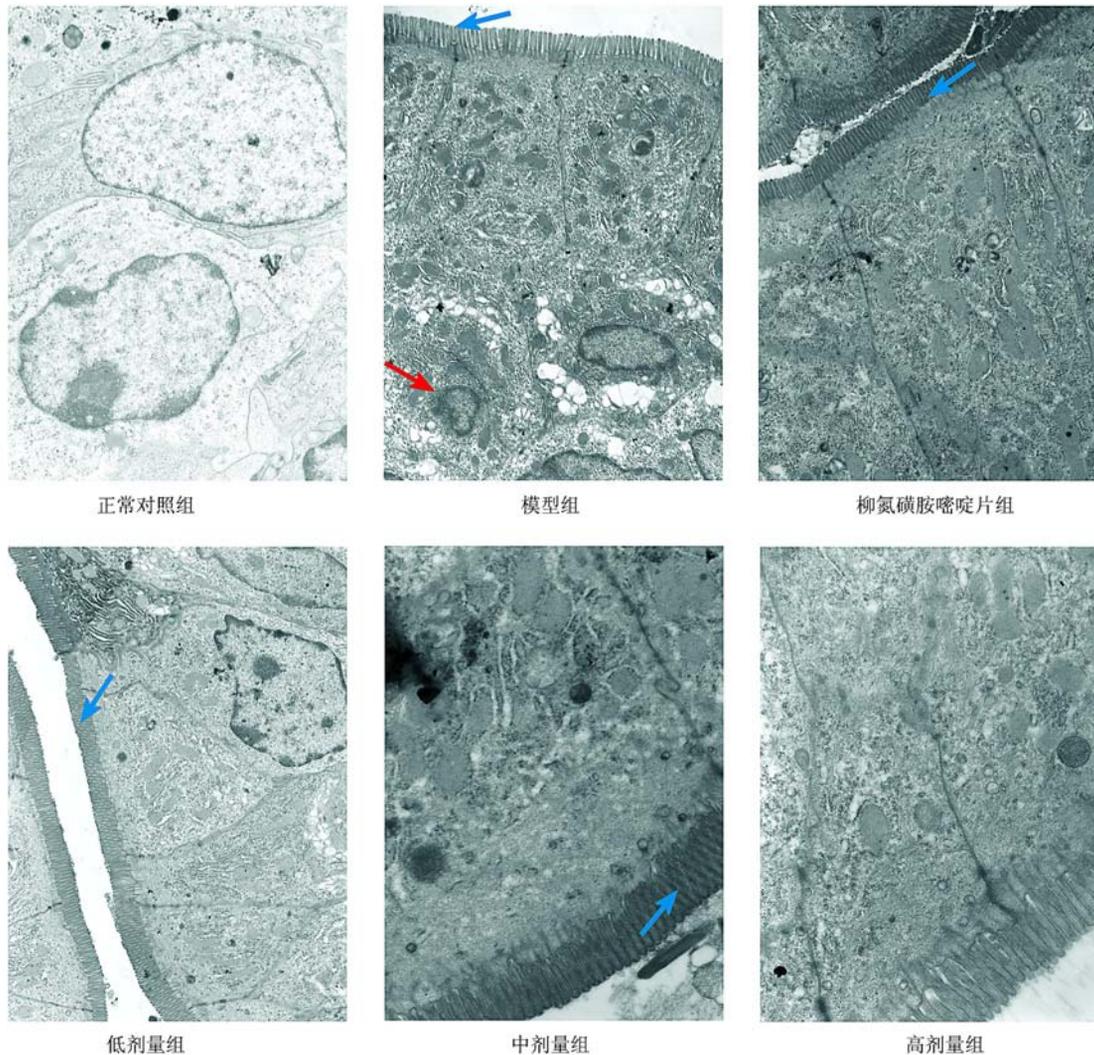


图2 溃疡性结肠炎大鼠结肠组织形态电镜检查(TEM, ×8 000)
→ . 上皮细胞核染色质聚集; → . 细胞表面微绒毛排列紊乱、断裂现象

黄连有助于清热燥湿,泻火解毒。用于湿热痞满,呕吐吞酸,泻痢,黄疸,高热神昏,心火亢盛,心烦不寐,血热吐衄,目赤,牙痛,消渴,痈肿疔疮。黄连舒肝和胃止呕,用于肝胃不和,呕吐吞酸和肠炎^[9]。黄连是一种很好的清热解毒消炎药,具有广谱抗菌的作用,对革兰阳性和阴性细菌、原虫及各型流感病毒、真菌类等均有一定的抑制作用。黄连生物碱均为黄连的主要抗菌活性成分,并且黄连碱的作用强度要明显强于黄连总生物碱和小檗碱。黄连及其有效成分可通过细胞毒作用抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡、增强机体免疫功能、调节细胞信号传导、抗氧化、诱导细胞分化等机制发挥抗肿瘤作用。实验中观察到,黄连水煎液能改善大鼠的一般状态,显著减轻结肠组织的病损程度,使得病变范围减小,黏膜缺损变浅,中性粒细胞浸润减少,促进溃疡愈合,对炎症急性期具有一定疗效。

笔者初步探讨了黄连水煎液对大鼠溃疡性结肠

炎的治疗作用,分别检测大鼠体质量、ACF数目、病理、电镜检查等,为黄连水煎液对溃疡性结肠炎治疗作用的研究提供了一定的理论依据和线索。关于黄连水煎液对溃疡性结肠炎治疗作用的具体机制,还有待进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] Lin JP, Yang JS, Lee JH, et al. Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(1): 21-28.
- [2] 董立, 石海莲, 季光, 等. 黄连和吴茱萸水提物对大鼠结肠癌前病变及结肠上皮增殖和凋亡的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(1): 66-68.
- [3] 李新艳, 郭文, 袁海峰, 等. 芥菜籽预防化学诱导小鼠大肠肿瘤的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(2): 97-101.
- [4] 王振军, 黄筵庭. 应进一步加强我国结肠癌的基础研究[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(9): 705.

表1 加样回收率试验结果(n=9)

甘氨酸理论浓度(mg/ml)	甘氨酸测得浓度(mg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
8.21	8.27	100.7		
8.21	8.27	100.7		
8.21	8.28	100.9		
10.33	10.52	101.8		
10.33	10.48	101.5	101.4	0.14
10.33	10.51	101.7		
11.90	12.12	101.8		
11.90	12.08	101.5		
11.90	12.11	101.8		

测。结果,甘氨酸衍生物峰面积与丙氨酸衍生物峰面积比分别为2.290 1、2.294 1、2.290 2、2.288 5, RSD为0.06%,表明衍生化样品在13 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批(批号为20141202N)样品6份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下方法进行衍生化,并按“2.3”色谱条件检测。结果制品中甘氨酸平均含量为8.66 mg/ml, RSD为1.76%(n=6),表明方法重复性良好。

2.10 样品含量测定 精密吸取按“2.1”项下方法制备的供试品溶液1.0 ml(批号20131006N、20131008N、20141202N),按“2.2”项下方法进行衍生化,并按“2.3”色谱条件检测。结果见表2。

表2 样品中甘氨酸含量测定结果(n=3)

批号	含量(mg/ml)	RSD(%)
20131006N	8.89	0.1
20131008N	8.56	1.6
20141202N	8.60	0.5

3 讨论

3.1 本实验采用丙氨酸为内标是因为它与甘氨酸

差一个基团-CH₂-,接近于同质,分离度大于1.5,互不干扰;空白人凝血因子Ⅷ样品色谱图在甘氨酸和丙氨酸衍生物峰位置处无相应峰出现,说明处方中其他成分对测定无干扰。

3.2 本实验采用碘基水杨酸为蛋白质沉淀剂,2,4-二硝基氟苯为柱前衍生剂,衍生化反应为氨基酸在碱性条件下定量地与过量的DNFB迅速缩合生成二硝基苯氨基酸(DNP-氨基酸),该衍生化后产物可采用紫外检测器检测。

3.3 本实验仪器配置要求不高,普通的带紫外检测器的高效液相设备即可进行,同时衍生化试剂用量少,成本低,易于购买。

3.4 本实验操作简单、方法灵敏,测定结果准确可靠,可用于人凝血因子Ⅷ制品中甘氨酸的含量测定。

【参考文献】

- [1] Schwarzinger I, Pabinger I, Kominger C, et al. Incidence of inhibitors in patients with severe and moderate hemophilia A treated with factor Ⅷ concentrates[J]. Am J Hematol, 2006, 24(3):241-245.
- [2] Van DK, Van Der Bom JG, Lenting PJ, et al. Factor Ⅷ half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A [J]. Haematologica, 2005, 90(4):494-498.
- [3] 赵艳华, 马平, 卜凤荣. 凝血因子分子生物学研究进展[J]. 生物技术通讯, 1999, 10(2):158-160.
- [4] 孙东坡, 胡一桥. 蛋白质冷冻干燥制品中的保护剂及其保护机制[J]. 药学进展, 2003, 27(4):202-205.
- [5] 李瑜, 江勇, 李爽. 反相高效液相色谱法测定发酵液中L-精氨酸含量[J]. 工业微生物, 2004, 34(3):32-34.
- [6] 尉小平, 冉铁成, 王坚, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定冻干人纤维蛋白原制品中盐酸精氨酸和甘氨酸的含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(8):609-611.

[收稿日期] 2015-06-20 [修回日期] 2015-10-30
[责任编辑] 顾文华

(上接第31页)

- [5] 文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 等. 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(19):1936-1941.
- [6] 张涛, 黄会云, 张志明, 等. DMH/DSS复合诱导小鼠溃疡性结肠炎相关癌变的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7):1744-1746.
- [7] 王冬飞, 沈晓伶, 王建国. 二甲胍和葡聚糖硫酸钠建立溃疡性结肠炎相关性大肠癌小鼠模型[J]. 胃肠病学和肝病杂志,

2006, 15(5):511-515.

- [8] 王水红, 马应杰. 大肠腺瘤性息肉临床病理特点及癌变相关因素分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(14):393-395.
- [9] 吴柯, 杨俊霞, 周岐新. 小檗碱对实验性大鼠结肠癌的防治作用与环氧化酶2关系的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20):2768-2773.

[收稿日期] 2015-01-29 [修回日期] 2015-07-25
[责任编辑] 顾文华