

· 药效与毒理学研究 ·

基于抗炎和氧化应激角度研究参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的作用机制

熊艳玲¹, 钟慧文¹, 陈雅茜¹, 王伟玮¹, 谢宗怡¹, 姜丽^{1,2,3}(1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西 南昌 330004; 2. 江西省中医病因生物学重点实验室, 江西 南昌 330004; 3. 江西省中药药理重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 研究参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)大鼠血清中炎症因子、抗氧化因子和缺氧相关指标的影响。**方法** 将 56 只雄性 SD 大鼠, 随机分为正常组, 脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组, 单纯溃疡性结肠炎模型组, 参苓白术颗粒低、中、高剂量组(0.472、0.945、1.89 g·kg⁻¹·d⁻¹), 阳性药组(柳氮磺吡啶 0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹), 每组 8 只。以病证结合法复制脾虚湿困模型大鼠, 再灌胃 5% 的葡聚糖硫酸钠(DSS)复制脾虚湿困溃疡性结肠炎模型; 单纯溃疡性结肠炎组模型复制期间仅灌胃 5% 葡聚糖硫酸钠。观察大鼠一般情况及结肠部位损伤情况, 计算疾病活动指数(DAI)、体质量、饮食增长率, 检测大鼠血清中诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)、血清降钙素(PCT)、C 反应蛋白(CRP)、髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、红细胞生成素(EPO)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)含量。**结果** 与正常组比较, 脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组大鼠疾病活动指数、PCT、CRP、EPO、HIF-1 α 含量均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 饮食增长率、iNOS、MPO、SOD、MDA 含量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$); 单纯溃疡性结肠炎模型组大鼠疾病活动指数、PCT 和 CRP 含量明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$), 体质量、饮食增长率、iNOS 和 MPO 含量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与单纯溃疡性结肠炎模型组比较, 脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠疾病活动指数、EPO 和 HIF-1 α 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), MDA 含量明显降低($P < 0.01$), 其它指标无统计学意义; 参苓白术颗粒中剂量组能明显降低脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的疾病活动指数及血清中 iNOS、PCT、CRP、EPO 含量($P < 0.01$), 提高饮食增长率、SOD 及 MPO 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 与单纯溃疡性结肠炎模型组比较, 脾虚湿困证可加重溃疡性结肠炎大鼠的炎症和缺氧症状。参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的结肠损伤有一定治疗作用, 可能是通过提高机体的抗炎及抗氧化能力起作用。

关键词: 参苓白术颗粒; 抗炎; 氧化应激; 脾虚湿困; 溃疡性结肠炎; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)02-0149-09

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2021.02.001

Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanism of Shenling Baizhu Granules on Experimental Ulcerative Colitis Rats with Dampness Stagnancy Due to Spleen Deficiency

XIONG Yanling¹, ZHONG Yiwen¹, CHEN Yaxi¹, WANG Weiwei¹, XIE Zongyi¹, JIANG Li^{1,2,3}(1. Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory of TCM Etiopathogenesis, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 3. Jiangxi Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Shenling baizhu granules on inflammatory and antioxidant factors in ulcerative colitis rats with dampness stagnancy due to spleen deficiency. **Methods** Totally 56 male SD rats were

收稿日期: 2020-06-10

作者简介: 熊艳玲, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理与药代动力学评价。Email: xiongyanling1009@163.com。通信作者: 姜丽, 女, 副教授, 研究方向: 中药药理与药代动力学评价。Email: jiangli1009@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81703823); 江西省自然科学基金项目(20192BAB205110); 江西省卫生厅中医药科技计划项目(2018B131); 江西省中药学双一流学科项目(JXSYLXK-ZHYA0120)。

divided into 7 groups: normal control group, ulcerative colitis with dampness stagnancy due to spleen deficiency model group (DSSD-UC), pure ulcerative colitis (P-UC) model group, low, medium and high dose of *Shenling baizhu* granules group (0.472, 0.945, 1.89 g·kg⁻¹·d⁻¹), positive drug group (salazosulfapyridine 0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹), 8 mice in each group. Except for the normal control group, the DSSD-UC model group was established by the combination of disease and syndrome, including diet and environment intervention and 5% DSS, while the P-UC model group was only administrated intragastrically with 5% DSS. After 30 days of treatment, the general condition of the rats and the injury of the colon were evaluated. The disease activity index (DAI) score, body weight, and food intake were measured. And the levels of iNOS, PCT, CRP, MPO, SOD, MDA, EPO and HIF-1 α in rat serum were determined. **Results** Compared with the normal control group, DAI score and the contents of PCT, CRP, EPO, HIF-1 α in DSSD-UC model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while food intake and the contents of iNOS, MPO, SOD and MDA were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The DAI score and the contents of PCT, CRP in P-UC group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while body weight, food intake, and the contents of iNOS, MPO were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The DAI score and the contents of EPO, HIF-1 α in DSSD-UC model group were significantly higher than that in the P-UC model group, while the MDA content were significantly lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The medium dose group of *Shenling baizhu* granules could reduce DAI score, the contents of iNOS, PCT, CRP, EPO ($P < 0.01$), and increase food intake, the contents of SOD, MPO in DSSD-UC rats serum ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Compared with the P-UC model group, the syndrome of dampness stagnancy due to spleen deficiency can aggravate the inflammation and hypoxia in UC rats. *Shenling baizhu* granules has a certain therapeutic effect on colon injury of DSSD-UC rats, which could be related to its anti-inflammatory and antioxidant effects.

Keywords: *Shenling baizhu* granules; anti-inflammatory; oxidative stress; dampness stagnancy due to spleen deficiency; ulcerative colitis; rats

溃疡性结肠炎 (Ulcerative colitis, UC) 是一种结、直肠的慢性非特异性炎症性肠病, 中医称其为“泄泻”“血痢”, 认为“脾虚湿困”为其关键病机, 其特征是从直肠到结肠发生长度不等的连续性黏膜炎症, 症状包括腹泻、腹部疼痛或不适、体质量减轻以及便血等^[1-2]。溃疡性结肠炎缓解期多以脾气虚弱、运化失调为主要病机, 脾虚湿困型为溃疡性结肠炎的临床常见证型, 故本病的治疗多以健脾益气、渗湿止泻为主要方法。

参苓白术颗粒出自《太平惠民合剂局方》, 作为治疗脾虚湿困溃疡性结肠炎的经典方剂, 主要通过调节炎症因子水平^[3]、机体免疫^[4]、肠道菌群^[5], 改善肠道屏障功能^[6]等发挥治疗作用。

溃疡性结肠炎与体内炎症反应密切相关, 诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、血清降钙素 (procalcitonin, PCT)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 等炎症因子以及能反映肠道炎症的髓过氧化物酶 (MPO) 在溃疡性结肠炎发生发展中发挥了重要的作用^[7-9]。此外, 氧自由基损

伤也可能是诱发溃疡性结肠炎的重要病因, 溃疡性结肠炎患者肠黏膜中氧自由基水平明显升高, 激活了机体的炎性介质, 参与并进一步加重了患者溃疡性结肠炎肠黏膜炎症的发生和发展^[10]。

本研究拟通过比较脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组与单纯溃疡性结肠炎模型组大鼠体内炎症因子、氧化因子和缺氧相关指标的差异, 探究脾虚湿困证对溃疡性结肠炎大鼠的影响; 通过考察参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清中 iNOS、PCT、CRP、MPO、SOD、MDA、EPO 及 HIF-1 α 水平的影响, 从抗炎和抗氧化应激的角度探讨参苓白术颗粒治疗脾虚湿困型溃疡性结肠炎的作用机制, 为预防和治疗脾虚湿困型溃疡性结肠炎及其相关性疾病的发生、发展提供新的思路与途径。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠 56 只, 雄性, SPF 级, 体质量 (220 \pm 20)g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公

司，生产许可证号：SCXK(湘)2009-0004，实验室许可证号：SYXK(赣)2017-0004。饲养环境的室温为(22 ± 2) °C，昼夜自然明暗交替照明，自由饮水。

1.2 仪器 SPARK 10M 多功能酶标仪，奥地利 TECAN 贸易有限公司；Milli-Q A10 超纯水系统，美国 Millipore 公司；VORTEX GENIUS 3 型涡旋振荡仪，德国 IKA 公司；Thermo Scientific SL 8R 型高速冷冻离心机，美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 药物及试剂 葡聚糖硫酸钠，美国 MP Biomedicals 公司，批号：S0432；生理盐水，江西科伦药业有限公司，批号：C19022201；参苓白术颗粒，北京同仁堂制药有限公司，批号：18111005；柳氮磺吡啶，上海信谊天平药业有限公司，批号：09190412；粪便隐血检测试剂盒，珠海贝索生物技术有限公司，批号：B190702；自制精炼猪油；iNOS ELISA 试剂盒(批号：9J295C)、PCT ELISA 试剂盒(批号：9J175C)、CRP ELISA 试剂盒(批号：9J175C)、EPO ELISA 试剂盒(批号：9K055C)，均购自伊艾博(武汉)科技股份有限公司；SOD 试剂盒(批号：20191129)、MDA 试剂盒(批号：20191206)，均购自南京建成生物工程研究所；HIF-1α ELISA 试剂盒，武汉华美生物工程有限公司 CUSABIO®，批号：N26039869。

1.4 分组、模型复制及给药 将大鼠随机分为正常组(8 只)、单纯溃疡性结肠炎模型组(8 只)和脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组(40 只)。适应性喂养 1 周后，正常组和单纯溃疡性结肠炎模型组正常供给饲料、饮水。脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组大鼠以病症结合法^[11]复制脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠模型：单日给予冰水灌胃(空腹，每只 2 mL·d⁻¹)并置于 2 cm 深的水中(8 h·d⁻¹)使其保持站立、游泳状态；双日给予精炼猪油灌胃(每只 3 mL·d⁻¹)并给予充足饲料和饮水，连续 48 d。在此期间，每隔 7 d 测定悬空拉

尾抵抗时间(手提大鼠尾巴，呈悬空状，从大鼠挣扎即开始计时，直至大鼠无力旋转挣扎，统计时间，可反映其乏力程度)。每天上午称体质量 1 次，并计算每日饮食量。脾虚湿困模型复制成功后，除正常组大鼠外，其余各组大鼠灌胃 5% 葡聚糖硫酸钠(0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)，复制溃疡性结肠炎模型，连续 8 d，继续体质量和饮食量的测定及观察大鼠粪便隐血情况和性状。

溃疡性结肠炎模型复制阶段结束后，正常组、脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组、单纯溃疡性结肠炎模型组大鼠按 2 mL·d⁻¹灌胃灭菌纯净水；参苓白术颗粒用去离子水溶解，分别配制成 0.625、1.25、0.25 g·mL⁻¹的浓度作为参苓白术颗粒低、中、高剂量组，根据人和动物体表面积折算的等效剂量比值表计算参苓白术颗粒低、中、高剂量组的灌胃剂量(0.472、0.945、1.89 g·kg⁻¹·d⁻¹)；阳性药组灌胃柳氮磺吡啶，以去离子水充分溶解后灌胃(0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)，各组大鼠给药周期均为 30 d。

1.5 脾虚湿困模型建立标准

1.5.1 脾虚湿困证动物模型宏观评估标准^[12-13] ①粪便时软、时溏；②食少纳呆；③消瘦，体质量减轻；④神态萎靡，四肢不收，毛色枯槁；⑤蜷缩聚堆；⑥易疲劳。第①②项为主症，第③~⑥项为兼症。具备两项主症和两项兼症时，即可以认为脾虚湿困证模型复制成功。

1.5.2 脾虚湿困证动物模型症状积分评分标准^[12-14] 见表 1。根据脾虚湿困症的临床表现及宏观体征诊断标准，拟定大鼠脾虚湿困模型症状量化积分表。具有大便稀溏、食少两项症状，且总积分≥4 分，认为脾虚模型复制成功。其中≤5 分为轻度，6~10 分为中度，>10 分为重度。

1.6 疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分标准 实验过程中记录大鼠的体质量、大便变化情况，根据表 2^[15]计算疾病活动指数。

表 1 脾虚湿困大鼠模型症状量化积分表

Table 1 Quantitative symptom scores of symptom of rat model with dampness stagnancy due to spleen deficiency

分数/分	症状				
	大便稀溏	食少	体质量增长率/%	倦怠	皮毛
0	无或成形	无	>10	无倦怠，反应灵敏，拉尾抵抗持续时间 >1 min	皮毛光泽
1	半成型，稍稀，拉尾排便反应呈阳性	食欲较差，食量减少 10%~20%	7~10 (含 7)	肢体稍倦，反应较灵活，拉尾抵抗持续时间 30~60 s	稍荣，少光泽
2	稀便，拉尾排便反应呈阳性	食欲不佳，食量减少 20%~40%	4~7 (含 4)	少动，乏力，拉尾抵抗持续时间 5~30 s	蓬松不荣
3	溏便，肛周污浊，拉尾排便反应强阳性	终日不欲进食	<4	无力，扎堆，拉尾抵抗持续时间 <5 s	枯槁无光泽

表 2 疾病活动指数评分

Table 2 Disease activity index score

分数/分	大便出血情况	体质量下降百分数/%	大便性状
0	正常	<1	正常
1	隐血阳性	1~4.99	略松散
2	肉眼出血	5~10	松散
3	血便	>10	稀溏

注: 疾病活动指数 = (大便出血情况评分 + 体质量下降百分数评分 + 大便性状评分) / 3

1.7 病理检查 实验结束后, 大鼠用 10% 水合氯醛 (3 mL·kg⁻¹) 麻醉, 取距肛门 8 cm 结肠, 剔除肠系膜, 沿纵轴剪开, 用 PBS 缓冲液清洗干净, 甲醛固定, 石蜡包埋; 切片, HE 染色后, 在光学显微镜下观察不同组别结肠的病变程度。

1.8 血清中 iNOS、PCT、CRP、MPO、SOD、MDA、EPO 及 HIF-1α 含量测定 实验末, 各组大鼠使用 10% 的水合氯醛 (3 mL·kg⁻¹) 腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 30 min 后于 4 °C、3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 获得血清样本。严格按照试剂盒说明书操作, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测。将试剂盒和待测血清样本平衡至室温, 稀释准备对照品和洗涤液, 按要求加样、温育、洗涤、显色、终止。酶标仪内测定 450 nm 波长时各孔 OD 值, 使用 Curve Expert 1.4 专业制作曲线软件进行分析, 根据样品的 OD 值由标准曲线计算 iNOS、PCT、CRP、MPO、EPO 及 HIF-1α 的浓度; 按照说明书操作, 用化学比色法测定 SOD 活性和 MDA 含量。

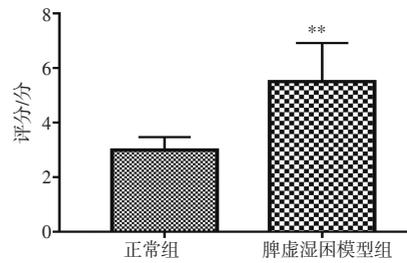
1.9 统计学处理方法 采用 GraphPad Prism 7.0 统计学软件进行处理分析, 计量资料数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异采用两样本均数比较的 *T* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脾虚湿困模型复制阶段

2.1.1 大鼠一般状况 正常组大鼠皮毛光泽, 反应灵敏, 大便正常, 体质量稳步增加, 精神状态良好。脾虚湿困大鼠逐渐出现饮食量减少, 体质量增长减慢; 精神萎靡, 嗜卧懒动, 蜷缩聚堆, 拱背、眯眼; 皮毛枯槁无光泽; 阴囊松弛下垂, 小便黄, 大便软或溏, 上述症状与中医脾虚湿困证相似。

2.1.2 脾虚湿困动物模型症状量化积分结果 见图 1。脾虚湿困模型复制阶段结束后, 对脾虚湿困情况进行评估, 脾虚湿困模型组评分明显高于正常组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。



注: 与正常组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01

图 1 正常组与脾虚湿困模型组脾虚湿困评分比较 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Figure 1 Comparison of normal group and ulcerative colitis rats with dampness stagnancy due to spleen deficiency group ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

2.2 大鼠疾病活动指数评分结果及实验期间体质量变化情况 见表 3。灌胃葡聚糖硫酸钠后, 除正常组外, 其余组大鼠出现黏液脓血便, 状态不佳。给药后, 各组整体均有改善。与正常组比较, 脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组和单纯溃疡性结肠炎模型组的疾病活动指数评分均明显升高 (*P* < 0.01), 饮食增长率均明显降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); 单纯溃疡性结肠炎模型组体质量增长率明显降低 (*P* < 0.01)。与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较, 单纯溃疡性结肠炎模型组与参苓白术颗粒低、中剂量组及阳性药组疾病活动指数评分均明显降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); 参苓白术颗粒低、高剂量组体质量增长率均明显升高 (*P* < 0.05); 参苓白术颗粒低、中、高剂量组及阳性药组饮食增长率均明显升高 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 且存在一定剂量依赖性。

表 3 各组大鼠疾病活动指数评分、体质量、饮食情况 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Table 3 The DAI score, body weight and food intake of various groups ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

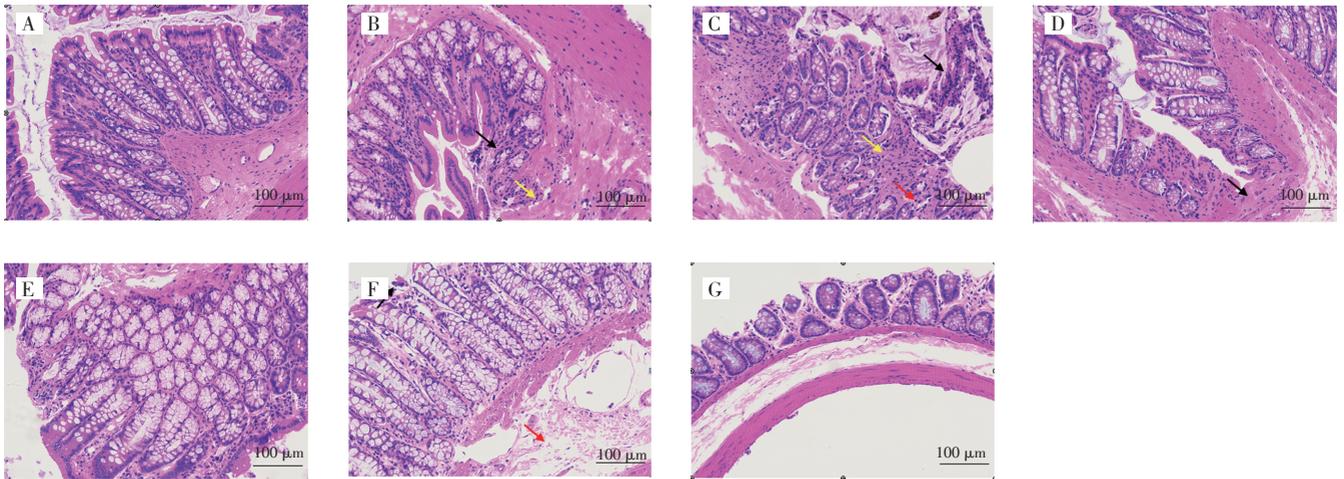
组别	疾病活动指数评分/分	体质量增长率/%	饮食增长率/%
正常组	0.63 ± 0.25	6.30 ± 1.50	13.91 ± 2.16
脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组	2.56 ± 0.50**	3.70 ± 11.92	8.92 ± 4.53*
单纯溃疡性结肠炎模型组	1.56 ± 0.58****	2.18 ± 1.87**	6.66 ± 1.96**
参苓白术颗粒低剂量组	1.96 ± 0.33 [†]	15.75 ± 3.61 [†]	30.38 ± 4.24**
参苓白术颗粒中剂量组	1.56 ± 0.29**	14.00 ± 5.36	71.52 ± 11.85**
参苓白术颗粒高剂量组	2.00 ± 0.52	14.79 ± 4.06 [†]	139.37 ± 15.77**
阳性药组	1.83 ± 0.31**	13.54 ± 2.94	16.55 ± 5.64 [†]

注: 与正常组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01; 与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较, [†]*P* < 0.05, *****P* < 0.01

2.3 病理学观察结果 见图 2。HE 染色显示, 正常组大鼠黏膜层肠上皮结构完整, 上皮细胞形态结构正常、排列紧密; 固有层肠腺丰富, 可见较多杯状细

胞，未见明显炎症。脾虚湿困溃疡性结肠炎组和单纯溃疡性结肠炎组大鼠黏膜层局部可见溃疡，较多肠上皮细胞脱落，固有层肠腺数量减少，结缔组织增生，并伴有少量淋巴细胞浸润。参苓白术颗粒低剂量组可见较多杯状细胞；黏膜下层局部可见中度水肿，结缔组织排列疏松。参苓白术颗粒高剂量组黏膜层少见上皮细胞脱落；固有层肠腺丰富，局部

可见少量淋巴细胞浸润。参苓白术颗粒中剂量组和阳性药组黏膜层多见上皮细胞脱落，固有层肠腺丰富，可见较多杯状细胞，黏膜下层可见大量水肿，结缔组织排列疏松。结果表明，阳性药柳氮磺吡啶和参苓白术颗粒各剂量均对脾虚湿困溃疡性结肠炎症状有一定改善作用。



A. 正常组; B. 脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组; C. 单纯溃疡性结肠炎模型组; D. 参苓白术颗粒低剂量组; E. 参苓白术颗粒中剂量组; F. 参苓白术颗粒高剂量组; G. 阳性药组

图 2 各组大鼠结肠病理组织切片(HE 染色, ×200)

Figure 2 Histopathological section of colon from all groups(HE staining, ×200)

2.4 参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清 iNOS、PCT、CRP、及 MPO 含量的影响 见表 4 和图 3。与正常组比较，脾虚湿困溃疡性结肠炎和单纯溃疡性结肠炎模型组大鼠血清 PCT 和 CRP 含量均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)，iNOS、MPO 含量均明显下降($P < 0.05$)。与单纯溃疡性结肠炎模型组比较，脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组上述指标升高，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较，参苓白术颗粒各剂量组及阳性药组可明显降低 iNOS、CRP 含量($P < 0.01$, $P < 0.05$)，且 CRP 含量随着参苓白术颗粒给药剂量的升高而升高，各剂量间存在一定的剂量依赖性；参苓白术颗粒中、高剂量组 PCT 含量明显降低($P < 0.01$)，参苓白术颗粒中剂量组 MPO 含量明显升高($P < 0.05$)。

2.5 参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清 SOD、MDA 含量的影响 见表 5 和图 3。与正常组比较，脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组血清 SOD 含量明显下降($P < 0.05$)，MDA 含量亦明显下降($P < 0.01$)；而单纯溃疡性结肠炎模型组上述指标无统计学意义

表 4 不同剂量参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清 iNOS、PCT、CRP 及 MPO 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Effects of different doses of Shenling baizhu granules on the contents of iNOS, PCT, CRP and MPO in the serum of ulcerative colitis rats with dampness stagnancy due to spleen deficiency($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	iNOS/(nmol·mL ⁻¹)	PCT/(ng·mL ⁻¹)	CRP/(ng·mL ⁻¹)	MPO/(ng·mL ⁻¹)
正常组	2.07 ± 0.27	2.21 ± 0.600	0.07 ± 0.009	1.78 ± 0.556
脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组	1.76 ± 0.08*	3.23 ± 0.487**	0.18 ± 0.021**	0.95 ± 0.553*
单纯溃疡性结肠炎模型组	1.64 ± 0.15*	3.26 ± 0.514*	0.14 ± 0.056**	0.85 ± 0.248*
参苓白术颗粒低剂量组	1.53 ± 0.06**	2.59 ± 0.594	0.05 ± 0.022**	1.24 ± 0.457
参苓白术颗粒中剂量组	1.58 ± 0.08**	2.26 ± 0.372**	0.06 ± 0.007**	2.88 ± 1.361*
参苓白术颗粒高剂量组	1.60 ± 0.13*	1.98 ± 0.349**	0.10 ± 0.023**	0.92 ± 0.485
阳性药组	1.56 ± 0.11**	2.97 ± 0.679	0.05 ± 0.020**	1.23 ± 0.940

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

($P > 0.05$)。与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较，单纯溃疡性结肠炎模型组和阳性药组 MDA 含量均明显升高($P < 0.01$)；参苓白术颗粒低、中、高剂量组可明显提高 SOD 和 MDA 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)，但各剂量组间差异无统计学意义。

表 5 不同剂量参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清 SOD、MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effects of different doses of *Shenling baizhu* granules on the contents of SOD and MDA in the serum of ulcerative colitis rats with dampness stagnancy due to spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
正常组	175.80 ± 8.53	4.83 ± 0.24
脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组	157.60 ± 16.57*	3.98 ± 0.36**
单纯溃疡性结肠炎模型组	167.51 ± 5.38	4.72 ± 0.42**
参苓白术颗粒低剂量组	179.97 ± 8.42*	4.92 ± 0.44**
参苓白术颗粒中剂量组	173.53 ± 9.41*	4.57 ± 0.44*
参苓白术颗粒高剂量组	178.96 ± 14.80*	4.70 ± 0.41**
阳性药组	167.57 ± 7.38	4.55 ± 0.28**

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

2.6 参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清 EPO、HIF-1 α 含量的影响

见表 6 和图 3。与正常组比较，脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组的 EPO、HIF-1 α 含量均明显升高($P < 0.01, P < 0.05$)；而单纯溃疡性结肠炎模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较，单纯溃疡性结肠炎模型组及参苓白术颗粒各剂量组和阳性组 EPO 含量均明显降低($P < 0.01$)，且存在一定剂量依赖性；单纯溃疡性结肠炎模型组及参苓白术颗粒高剂量组和阳性药组 HIF-1 α 含量均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 6 不同剂量参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清 EPO、HIF-1 α 含量影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 6 Effects of different doses of *Shenling baizhu* granules on the contents of EPO and HIF-1 α in the serum of ulcerative colitis rats with dampness stagnancy due to spleen deficiency ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	EPO/(ng·mL ⁻¹)	HIF-1 α /(ng·mL ⁻¹)
正常组	0.13 ± 0.003	10.38 ± 2.232
脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组	0.18 ± 0.005**	15.81 ± 2.579*
单纯溃疡性结肠炎模型组	0.14 ± 0.008**	11.13 ± 2.460*
参苓白术颗粒低剂量组	0.12 ± 0.004**	22.65 ± 5.149
参苓白术颗粒中剂量组	0.13 ± 0.008**	20.36 ± 4.995
参苓白术颗粒高剂量组	0.14 ± 0.002**	9.03 ± 2.167**
阳性药组	0.13 ± 0.002**	8.94 ± 2.137**

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

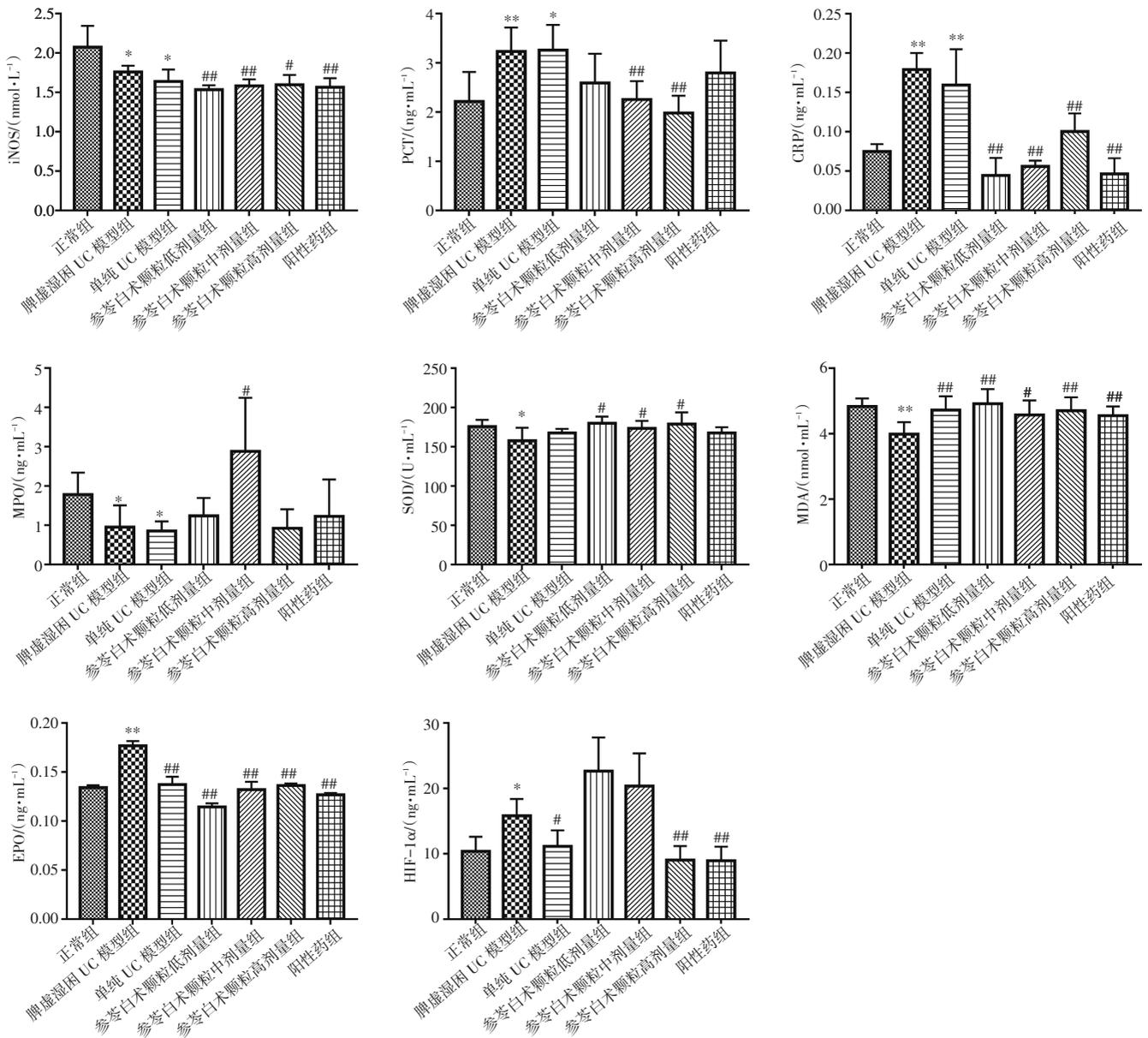
3 讨论

对于脾虚湿困型溃疡性结肠炎，脾虚是此病之

本，湿困为标，脾虚与湿困互相影响。《脾胃论》载：“饮食失节，甘肥过度，脾胃乃伤”。过饥过饱、生冷不忌，过食油腻，则脾胃受损，湿从内生。中医认为，若体质虚弱、作息失调，有损脾气；情志不达、气机不畅，遂脾运化水湿的功能减弱，水湿停滞，形成脾虚湿困证。因此，本实验在模型复制期间，使大鼠在水中站立 8 h，控制睡眠，使其疲劳、情志不达且外湿盛；在饥饿的情况下冰水灌胃，饱食的情况下猪油灌胃，使其饮食失宜，在同时干预环境和饮食的情况下建立脾虚湿困模型。在此期间，大鼠出现嗜睡懒动、蜷缩、纳呆、精神萎靡、毛发疏松粗糙、晦暗无光泽、腹泻等类似人体脾虚湿困证候的表现。根据脾虚评分，此模型大鼠为中度脾虚；根据疾病活动指数评分显示，脾虚湿困型溃疡性结肠炎较单纯溃疡性结肠炎更加严重，表明模型复制成功。另外，我们采用目前常用的葡聚糖硫酸钠方法复制溃疡性结肠炎大鼠模型，此模型复制方法的条件和操作简单，重复性良好。两种建模方法结合，建立脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠模型。

本实验将大鼠分为 7 组，正常组，脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组，单纯溃疡性结肠炎模型组，参苓白术颗粒低、中、高剂量组及阳性药组。旨在对比单纯溃疡性结肠炎模型组与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组体内炎症因子、氧化因子和缺氧相关指标的差异，并研究参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎的治疗效果。

iNOS 可减轻肠黏膜损伤，促进组织修复^[9,16]。PCT 是没有激素活性的降钙素的前体物，由肝脏、脾、肺、小肠等单核细胞分泌，其在炎症及创伤患者血清中水平明显升高，可用于评价感染性和非感染性炎症反应^[17]。CRP 是最为常用的一种血清标志物，是机体受到微生物入侵或组织损伤等炎症性刺激时肝细胞合成的急性相蛋白，可作为评价炎症性结肠炎疾病活动性的指标^[18]。MPO 是中性粒细胞遇到刺激时释放的一种糖蛋白，在中性粒细胞被激活后释放到细胞外或吞噬小体内，促进一系列过氧化应激反应，进而加快肠道局部炎症的发展^[19-20]。本实验通过检测大鼠血清中 iNOS、PCT、CRP、MPO 含量发现，脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组与单纯溃疡性结肠炎模型组比较，iNOS、PCT、CRP、MPO 含量虽无明显差异，但含量都稍高于单纯溃疡性结肠炎模



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图 3 不同剂量参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎(UC)大鼠血清中 iNOS、PCT、CRP、MPO、SOD、MDA、EPO、HIF-1 α 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Figure 3 Effects of different doses of *Shenling baizhu* granules on the levels of iNOS, PCT, CRP, MPO, SOD, MDA, EPO, HIF-1 α in the serum of ulcerative colitis rats with dampness stagnancy due to spleen deficiency($\bar{x} \pm s, n=8$)

型组，可见脾虚湿困溃疡性结肠炎的炎症水平比单纯溃疡性结肠炎高。给予参苓白术颗粒后，PCT、CRP 含量均明显下降，表明参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的炎症症状有一定改善作用。与正常组比较，模型组 iNOS 和 MPO 含量却明显下降，与文献报道的变化趋势相反，给药后，iNOS 含量继续下降，推测可能是机体发生了负反馈调节，

使得 iNOS、MPO 含量与预期相反，或是复方中某些成分会影响 iNOS 通路中上下游基因进而减少 iNOS 含量，亦有可能参苓白术颗粒并不通过此途径对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠进行治疗。本研究采用脾虚湿困溃疡性结肠炎模型，观察参苓白术颗粒给药干预后大鼠血清中炎症因子的水平，发现参苓白术颗粒可能是通过调节体内 PCT 和 CRP 的水平，降

低机体炎症反应程度发挥治疗作用。

研究^[21]表明,多种实验性胃肠黏膜损伤及胃肠疾病的发病有氧自由基参与,而溃疡性结肠炎患者病变后肠黏膜反应性氧代谢产物增加,故活性氧代谢物对于治疗溃疡性结肠炎有着重要的作用,可通过调控促氧化与抗氧化间的平衡以达到抗氧化的效果,从而有效治疗实验性结肠炎。MDA、SOD是氧化应激反应的重要标志,过多的氧自由基会促使MDA分泌增多,SOD通过清除氧自由基,减少脂质过氧化物,从而改善肠道的炎症反应。通常,溃疡性结肠炎患者血清中SOD含量降低,MDA含量升高^[22]。在本实验中,两个模型组SOD含量低于正常组,与单纯溃疡性结肠炎模型组比较,脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组SOD含量更低,说明脾虚湿困证可降低溃疡性结肠炎大鼠的抗氧化水平。给予参苓白术颗粒治疗后,SOD含量明显上升,说明参苓白术颗粒可以通过清除氧自由基,进而促进肠黏膜损伤修复。但MDA趋势却与预期结果不一致,故推测可能是机体发生了负反馈调节。

在溃疡性结肠炎疾病的发展过程中,上皮细胞的再生、凋亡以及淋巴细胞的增生、代谢均可能造成患者肠道黏膜的氧供应失衡。HIF-1 α 是受控于氧浓度变化的一个至关重要的转录因子,是缺氧条件下产生的具有转录活性的核蛋白,通常只能在缺氧状态下稳定表达^[23]。EPO是特异性作用于红系祖细胞的糖蛋白激素,主要的生物学作用是促进红系祖细胞的增殖、分化和成熟,对机体供氧状况发挥重要的调控作用^[24]。有研究报道指出,HIF-1 α 与红细胞生成素相关基因增强子相互结合组成核酸序列,红细胞无法与氧气结合,进而导致HIF-1 α 明显上升^[25]。本研究发现,与正常组比较,脾虚湿困溃疡性结肠炎模型和单纯溃疡性结肠炎模型大鼠血清中EPO和HIF-1 α 含量均升高,且脾虚湿困溃疡性结肠炎模型组明显高于单纯溃疡性结肠炎模型组,说明脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠体内缺氧程度更大。参苓白术颗粒对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清中HIF-1 α 及EPO含量具有一定调控作用,高剂量组能降低脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠血清中HIF-1 α 和EPO含量,改善脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的慢性缺氧状态,提高其机体的抗氧化能力。故参苓白术颗粒除了通过提高体内SOD含量而达到抗氧化能力以外,同时还可通过降低HIF-1 α 和EPO含量共同提高机

体的抗氧化能力。

量效关系是指药量与疗效之间的相关性。本研究探究不同给药剂量对脾虚湿困溃疡性结肠炎大鼠的治疗效果。其中参苓白术颗粒对EPO和CRP含量影响具有明显的量效关系,而对SOD、MDA、HIF-1 α 等指标则不然。由此可见,中药复方的量效关系复杂,是一个多元的非线性关系。对于中药复方的疗效,需要考虑多种因素的影响,包括病证、用药人群和用药时间等。其中“证”的因素对方药关系的理解尤为重要,方药量效关系是一种“证-量-效关系”^[26]。其次要考虑临床病证的复杂性,以及患者的个体差异和对方药的反应性^[27]。因此,中医临床处方用药应该在辨证论治的原则下,讲究方药用量控制策略与方法,随证施量。

综上所述,参苓白术颗粒能够通过降低炎症因子水平,增加机体抗氧化作用,从而达到治疗脾虚湿困溃疡性结肠炎的作用,但其更深入的机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] MACKEN L, BLAKER P A. Management of acute severe ulcerative colitis (NICE CG 166) [J]. Clinical medicine (London, England), 2015, 15(5): 473-476.
- [2] 王新月, 田德禄. 溃疡性结肠炎病因病理特点与中医辨治思路对策[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(8): 554-559.
- [3] 周华, 张敏, 吴芳, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎的抗炎作用及机制研究[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(19): 1455-1460.
- [4] 李晓冰, 崔利宏, 陈玉龙, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎小鼠肠道调节性T细胞免疫调节作用[J]. 中成药, 2014, 36(6): 1295-1297.
- [5] 孙娟, 王键, 胡建鹏, 等. 参苓白术散对脾虚湿困证溃疡性结肠炎大鼠结肠菌群的影响[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(4): 1-4.
- [6] 刘翠英, 施家希, 黄娟, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎小鼠紧密连接及MLCK/MLC通路的影响[J]. 中药材, 2018, 41(9): 2180-2184.
- [7] 何旭林, 孙平. 柳氮磺吡啶联合康复新液对溃疡性结肠炎患者血清PCT、CRP水平及肠黏膜的影响[J]. 中国肛肠病杂志, 2019, 39(7): 16-18.
- [8] 王金乐, 陈娟, 张蓉, 等. FCP、MPO、ESR、CRP评价溃疡性结肠炎活动度的应用价值分析[J]. 结直肠肛门外科, 2019, 25(3): 311-314.
- [9] 陈香宇, 段芳龄, 李建生, 等. NO、NOS在大鼠实验性结肠炎中的动态变化及意义[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2002, 11(2): 120-123.
- [10] 史伟, 孙东雪, 胡阳. 加味参苓白术散对溃疡性结肠炎患者血清

- SOD、MDA 水平的影响[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(3): 65-68.
- [11] 李姿慧, 王键, 蔡荣林, 等. 脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立与评价[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(8): 90-96.
- [12] 中华人民共和国卫生部药政局. 中药治疗脾虚证的临床研究指导原则[J]. 中华中医药杂志, 1988, 3(5): 71-72.
- [13] 陈小野, 周永生, 樊雅莉, 等. 脾气虚证动物模型规范化的初步研究[J]. 中华中医药杂志, 2001, 16(4): 52-58.
- [14] 彭芬. 艾灸足三里等穴对实验性脾虚证大鼠蛋白质代谢的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- [15] SÁNSHEZ-FIDALGO S, CÁRDENO A, SÁNCHEZ-HIDALGO M, et al. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(7): 1401-1413.
- [16] JOAQUIM S, FÉLIX G, MERITXELL G, et al. Down-regulation of endothelial adhesion molecules and leukocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2005, 11(10): 872-882.
- [17] HU L, SHI Q, SHI M, et al. Diagnostic value of PCT and CRP for detecting serious bacterial infections in patients with fever of unknown origin: a systematic review and meta-analysis[J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology Aimm, 2017, 25(8): 61-69.
- [18] SANDS, BRUCE E. Biomarkers of inflammation in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 2015, 149(5): 1275-1285.
- [19] CHOWDHURY F H, HAQUE M R, KAWSAR K A, et al. Umbilical cord serum interleukin-6, C-reactive protein, and myeloperoxidase concentrations at birth and association with neonatal morbidities and long-term neurodevelopmental outcomes[J]. American Journal of Perinatology, 2014, 31(8): 717-726.
- [20] 柏明见, 冯璟, 冯珍如, 等. 血清及粪便髓过氧化物酶测定对溃疡性结肠炎患者辅助诊断与疾病活动性监测中的应用价值[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(3): 413-416.
- [21] QIAN X, LI X, CAI Q, et al. Phosphoglycerate Kinase 1 Phosphorylates Beclin1 to induce autophagy[J]. Molecular Cell, 2017, 65(5): 917-931.
- [22] 刘志龙, 赵佩, 高进贤, 等. 铁皮石斛提取物对DSS诱导的溃疡性结肠炎小鼠的抗氧化及抗炎作用[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(2): 90-96.
- [23] 李昭, 王学彬. 缺氧诱导因子-1 α 在风湿性疾病中的研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2018, 22(1): 54-57.
- [24] 李静, 王亚平. 促红细胞生成素与红细胞生成的调控[J]. 国际检验医学杂志, 2001, 22(5): 239-241.
- [25] JUBEH T T, NADLER-MILBAUER M, BARENHOLZ Y, et al. Local treatment of experimental colitis in the rat by negatively charged liposomes of catalase, TMN and SOD[J]. Journal of Drug Targeting, 2006, 14(3): 155-163.
- [26] 全小林, 赵林华, 焦拥政, 等. 方药量效关系研究思路探讨[J]. 中医杂志, 2010, 51(11): 965-967.
- [27] 傅延龄, 蔡坤坐, 宋佳. 方药量效关系文献与理论研究思考[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(9): 29-33.

(编辑: 修春)

《中药新药与临床药理》“临床研究”栏目2021年扩大征稿

为更全面地反映中医药学术研究成果, 打造高质量的中医药学术交流平台, 优化杂志学科内容结构及满足作者的需求, 本刊拟从2021年起加强对临床中药研究科研成果的报道。栏目论文基本要求:

1. 研究对象: 中药新药(各期临床研究)、新上市后的中药制剂、医院中药制剂及已有一定研究基础的中药汤剂等。
2. 研究类型: 临床随机对照试验。

投稿网站: www.zyxy.com.cn。本刊只接受稿件采编系统投稿, 不接收纸质和Email投稿, 系统投稿不收取审稿费。

入选核心期刊情况: 本刊为中国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)及RCCSE中国核心学术期刊。