



IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 在脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠血清及组织中的表达

殷银霞^{1,2}, 许雅清¹, 李海龙^{1,3}, 邱家权¹, 程小丽¹, 明海霞¹, 梁永林¹, 吴玉泓^{1*}

(1. 甘肃中医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院附属医院, 兰州 730020;
3. 甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000)

【摘要】 目的 通过对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎(UC)模型大鼠血清及结肠组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 表达水平的检测,探讨它们在 UC 发生发展过程中的作用。方法 采用灌服大黄水煎液 + 肌肉注射氢化可的松并结合 TNBS(2,4,6-三硝基苯磺酸) + 乙醇灌肠建立脾肾阳虚型 UC 动物模型。将 60 只大鼠随机分为空白组、脾肾阳虚型 UC 模型 7、14d 及 21d 组,采用酶联免疫法检测各组大鼠血清及结肠组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 的含量。结果 与空白组比较,脾肾阳虚型 UC 模型组大鼠血清及结肠组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 含量明显升高($P < 0.05$);尤以模型 21d 组最为明显。结论 促炎性细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 在脾肾阳虚型 UC 发病过程中起重要作用。

【关键词】 溃疡性结肠炎;脾肾阳虚;白细胞介素;肿瘤坏死因子- α ;干扰素- γ ;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)02-0139-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.02.007

Expression and significance of IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ in serum and colon tissue in the rat models of ulcerative colitis with spleen and kidney yang deficiency

YIN Yin-xia^{1,2}, XU Ya-qing¹, LI Hai-long^{1,3}, QIU Jia-quan¹, CHENG Xiao-li¹,
MING Hai-xia¹, LIANG Yong-lin¹, WU Yu-hong^{1*}

(1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu College of Traditional Chinese Medicine Hospital, Lanzhou 730020;

3. Gansu Province Chinese Medicine Engineering Laboratory of New Products, Lanzhou 730000)

【Abstract】 **Objective** To detect the levels of IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ in serum and colon tissue of rat models of ulcerative colitis with spleen and kidney Yang deficiency, and to explore their roles in the pathogenesis of ulcerative colitis (UC). **Methods** The rat model of ulcerative colitis with Yang deficiency of spleen and kidney was induced by perfusion of rhubarb decoction plus intramuscular injection of hydrocortisone and combined with TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) and ethanol enema. Sixty SPF wistar rats (body weight 180 ± 10 g, male:female = 1:1) were randomly divided into blank control group, UC model with spleen kidney Yang deficiency for 7 days, 14 days and 21 days groups, respectively. The levels of IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ in serum and colon tissue were detected by ELISA. **Results** Compared with the blank group, the levels of IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ in serum and colon tissue of rat UC model group with spleen kidney Yang deficiency were greatly increased ($P < 0.05$), especially evidently increased in the model group at 21 days. **Conclusions** The pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ play an important

【基金项目】国家自然科学基金项目(81260520)。

【作者简介】殷银霞(1968-),女,专业:老年病及呼吸病,研究方向:中医治则治法研究。

【通讯作者】吴玉泓,男,博士,硕士生导师。研究方向:中医病证结合动物模型及治则治法研究。Email: yhw67@126.com

role in the pathogenesis of ulcerative colitis with syndrome of spleen and kidney Yang deficiency.

【Key words】 Ulcerative colitis; Yang deficiency of spleen and kidney; Interleukin; Tumor necrosis factor alpha; Interferon gamma; Enzyme linked immunosorbent assay; Rat

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种结肠黏膜及黏膜下的慢性炎症反应, 临床以腹痛、腹泻、黏液脓血便及里急后重为主要表现, 近年来国内患病人数日渐增多, 成为常见的消化系统疾病^[1]。UC 的确切病因和发病机制迄今未明, 多数学者认为, 可能是遗传、环境和免疫等多因素共同作用的结果, 细胞因子失衡又是 UC 产生肠道非特异性炎症反应的关键环节, 而且目前促炎细胞因子及抑炎细胞因子失衡机制也越来越受到人们的重视^[2]。国内学者王天芳等^[3]通过系统检索评价各数据库文献对 UC 中医证候进行整理, 结果提示脾肾阳虚型 UC 发生率位居 UC 各类型证候之首^[4]。本实验通过酶联免疫法来研究促炎性细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 与溃疡性结肠炎的关系, 阐明它们在脾肾阳虚型 UC 发病中的作用。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 体重 (180 \pm 10) g, 雌雄各半, 雄鼠鼠龄为 40 日龄左右, 雌鼠鼠龄为 45 日龄左右。由甘肃中医学院实验动物中心提供【SCXK (甘) 2011-0001-00013】。动物饲养在甘肃中医学院实验中心 SPF 级实验室【SYXK (甘) 2011-0001-00013】, 饲养动物所需的笼具及水瓶均由以上实验室经高压灭菌后提供。

1.2 药品、试剂及主要仪器

三硝基苯磺酸 (TNBS, 购自 Sigma 公司, 批号 111M5001V); 氢化可的松注射液 (批号 13060211); 白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ) Elisa 试剂盒 (批号 20140301A) 购自南京建成生物工程研究所。

大黄水煎液制备: 大黄中药材 (购自甘肃中医学院附属医院中药房), 常规水煎后, 按 13.5 g (生药)/kg 体质量计量浓缩到浓度为 1.35 g/mL。

1.3 主要仪器

Benchmark Plus 连续波长酶标仪 (美国 Bio-Rad), 高速冷冻离心机 (Biofuge-Stratos), 水浴锅 (DZKW-4 型), 匀浆器。

2 实验方法

2.1 分组与造模

在 SPF 级实验室 (室温在 21 ~ 27 $^{\circ}$ C) 适应性饲养一周后, 将 60 只大鼠按体重及雌雄用随机数字表法分为 4 组, 每组 15 只。脾肾阳虚型模型参考文献方法^[5-6]。第一阶段复制脾虚模型: 上午灌服大黄水煎液, 每只 2 mL/d, 下午灌服蒸馏水每只 2 mL/d, 连续 14 d; 第二阶段在脾虚基础上继续复制脾肾阳虚模型: 第 15 天在大鼠左右肢臀部交替注射肌肉注射氢化可的松 25 mg/(kg \cdot d), 并灌服蒸馏水 2 mL/d, 连续 10 d。第 25 天禁食不禁水, 第 26 天用 100 mg/kg TNBS 加 50% 乙醇 0.25 mL 混合试剂灌肠, 复合法建立脾肾阳虚型 UC 大鼠模型。

2.2 标本采集及处理

空白组于造模 21 d 末, 脾肾阳虚型 UC 模型组于造模 7、14、21 d 末采集血清/结肠组织, 水合氯醛麻醉采血后安乐死并制备待检标本。血清制备: 股动脉取血, 3000 r/min 离心 10 min, 取血清置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 待测。结肠组织匀浆制备: 截取结肠病变处, 冲洗、称重后用眼科剪剪碎, 加 9 倍生理盐水匀浆, 以 12,000 r/min 离心 10 min, 将上清分装置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 待测。ELISA 法检测血清及结肠组织 IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 含量, 具体操作参照试剂盒说明书。

2.3 统计学处理

统计数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 16.0 软件包处理, 根据方差齐性检验结果, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般生存状况

空白组大鼠始终表现为反应灵敏, 活动及饮食量正常, 毛发浓密柔顺而有光泽, 粪便呈棕褐色颗粒状。脾肾阳虚型 UC 大鼠模型组多数在第 3 天后天开始出现蜷卧、眯眼等部分症状, 第 9 天后症状开始明显, 大鼠蜷卧扎堆, 食量减少, 体重开始减轻, 便形质软, 部分动物眯眼弓背, 游泳耐力下降。往后动物症状逐渐加重, 体重明显减轻, 便形稀溏, 肛周污秽,

少食怠动,畏寒,成群蜷缩或弓背,毛发失去光泽而枯槁疏散等脾肾阳虚症状。第 16 天后部分大鼠症状有稍微减轻,其余大鼠症状仍然严重。

3.2 各组大鼠血清和结肠组织中 IL-1 含量比较

见表 1,结果表明,与空白组比较,模型组大鼠血清和结肠组织中 IL-1 含量明显升高 ($P < 0.05$),差异具有明显统计学意义,其中以模型 21d 组升高最为明显。

表 1 各组大鼠血清和结肠组织中 IL-1 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

Tab. 1 Comparison of the levels of IL-1 in serum and colon tissue of the rats.

组别 Groups	血清 IL-1 Serum IL-1	结肠 IL-1 Colon tissue IL-1
空白组 Blank control group	7.274 ± 8.811	7.139 ± 5.005
模型 7 d 组 Model group, 7 days	8.202 ± 9.029 [▲]	9.800 ± 5.910 [▲]
模型 14 天组 Model group, 14 days	9.082 ± 8.312 [▲]	10.155 ± 8.432 [▲]
模型 21 天组 Model group, 21 days	9.712 ± 6.589 [▲]	11.820 ± 8.491 ^{▲▲}

注:与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$,实验过程中模型 7d 组、14d 组和 21d 组分别死亡 1 只、1 只和 2 只,故检测时每组都统一选取 10 只,下同。

Note. Compared with the blank group, ▲ $P < 0.05$. ▲▲ $P < 0.01$, one rat in the model groups died at days 7, 14 and 21 days, respectively, during the experiment. So that 10 rats were selected in each group. The notes are the same below.

3.3 各组大鼠血清和结肠组织中 IL-6 含量比较

见表 2,结果表明,与空白组比较,模型组大鼠血清及结肠组织中 IL-6 含量明显升高 ($P < 0.05$),差异有显著性。尤以模型 21 d 组最为明显。

表 2 各组大鼠血清和结肠组织中 IL-6 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

Tab. 2 Comparison of IL-6 levels in the serum and colon tissue of the rats.

组别 Groups	血清 IL-6 Serum IL-6	结肠 IL-6 Colon tissue IL-6
空白组 Blank control group	5.997 ± 0.097	6.315 ± 7.554
模型 7 天组 Model group, 7 days	6.279 ± 2.790 [▲]	8.852 ± 5.896 [▲]
模型 14 天组 Mdel group, 14 days	7.432 ± 1.146 [▲]	9.142 ± 8.020 [▲]
模型 21 天组 Model group, 21 days	8.132 ± 3.567 ^{▲▲}	10.895 ± 8.644 ^{▲▲}

3.4 各组大鼠血清和结肠组织中 TNF-α 含量比较

见表 3,结果表明,与空白组比较,模型组大鼠血清和结肠组织中 TNF-α 含量明显升高 ($P < 0.05$),差异有显著性,其中尤以模型 21 d 组升高最

为明显。

表 3 各组大鼠血清和结肠组织中 TNF-α 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

Tab. 3 Comparison of TNF-α levels in serum and colon tissue of the rats.

组别 Groups	血清 TNF-α Serum TNF-α	结肠 TNF-α Colon tissue TNF-α
空白组 Blank control group	1.775 ± 3.494	1.967 ± 7.292
模型 7 天组 Model group, 7 days	1.945 ± 3.660 [▲]	2.363 ± 7.713 [▲]
模型 14 天组 Model group, 14 days	2.071 ± 7.594 ^{▲▲}	2.697 ± 8.447 [▲]
模型 21 天组 Model group, 21 days	2.187 ± 7.627 [▲]	3.112 ± 7.728 ^{▲▲}

3.5 各组大鼠血清和结肠组织中 IFN-γ 含量比较

表 4 实验结果表明,与空白组比较,模型组大鼠血清和结肠组织中 IFN-γ 含量明显升高 ($P < 0.05$),差异有显著性,其中模型 21d 组最为明显。

表 4 各组大鼠血清和结肠组织中 IFN-γ 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

Tab. 4 Comparison of IFN-γ levels in serum and colon tissue of the rats.

组别 Groups	血清 IFN-γ Serum IFN-γ	结肠 IFN-γ Colon tissue IFN-γ
空白组 Blank control group	5.437 ± 1.661	7.183 ± 2.672
模型 7 天组 Model group, 7 days	6.218 ± 1.924 [▲]	8.640 ± 2.364 [▲]
模型 14 天组 Model group, 14 days	6.954 ± 1.080 ^{*△}	8.984 ± 1.892 ^{*△}
模型 21 天组 Model group, 21 days	7.159 ± 5.053 ^{*△}	9.656 ± 1.614 ^{*△}

4 讨论

UC 又称为非特异性溃疡性结肠炎,被认为是结肠癌前病变^[7],炎症肠病在西方国家相当常见,国内近 10 年亦呈上升趋势。与 UC 关系密切的促炎因子主要有 IL-1、IL-6、TNF-α、IFN-γ 等,在 UC 的组织破坏及炎症反应中起着重要作用^[8]。

其中 IL-1 是一种多肽类细胞因子,主要由单核巨噬细胞产生,在炎症和免疫反应中它是一个关键的介质。IL-1 通过免疫上调(激活 T 细胞和 B 细胞、促进中性粒细胞浸润、促进 IL-2 受体表达、和其他细胞因子协同作用、促进其他细胞因子表达)和促进炎症活性(促使中性粒细胞和巨噬细胞活化及脱颗粒、促进炎症细胞释放前列腺素、血栓素、血小板活化因子等、增加上皮细胞和内皮细胞的通透

性)而发挥作用。文献^[9]报道活动期溃疡性结肠炎患者病变黏膜组织以及从中分离出的固有层单核细胞产生的 IL-1 较对照组明显增高。在本研究中,通过检测血清和组织中 IL-1 的含量,进而加以分析,也证实了在 UC 中该炎症因子确实是呈增高趋势,并且随着时间的推移,炎症越发严重。

IL-6 是一种作用广泛的促炎性因子,其促炎性作用包括:(1)促进 B 细胞活化、增生并最终分化为浆细胞,增加免疫球蛋白合成;(2)促进 T 细胞增殖、刺激细胞毒性 T 细胞反应;(3)激活 G0 期造血干细胞进入 G1 期,使粒细胞、单核细胞和巨噬细胞增殖;(4)在体内外均可诱导肝细胞生成急性期蛋白。一系列研究发现溃疡性结肠炎患者血清 IL-6 浓度明显升高,且与病变范围和病变严重程度成正相关^[10]。通过本实验不难看出 IL-6 在 UC 中表达明显。

TNF- α 和 IFN- γ 也是两种在炎症过程中有重要作用的炎症因子,比如 TNF- α 主要由活化的单核细胞和巨噬细胞产生,主要以旁分泌和自分泌的方式在肠黏膜局部发挥作用。TNF- α 具有上调血管内皮细胞黏附分子 ELAM-1、ICAM-1、VCAM-a 的表达,诱导内皮细胞产生血小板活化因子和趋化性细胞因子 IL-8 的功能^[11]。这些因素导致循环中中性粒细胞、淋巴细胞及单核巨噬细胞等与血管内皮细胞黏附,进而迁移和外渗至局部组织,引起炎症反应。而 IFN- γ 是一种二聚体糖蛋白,由 Th1 淋巴细胞和 NK 细胞产生,它的免疫调节活性强,是强有力的吞噬细胞和中性粒细胞激活物^[12],在炎症反应中也参与调节,我们发现实验中溃疡性结肠炎模型大鼠不同时期大肠黏膜中 IFN- γ 等这些促炎因子表达量都有所增加,明显高于空白组,由此可以认为在溃疡性结肠炎发病过程中 IFN- γ 、TNF- α 等都起着很重要的作用,可能加重肠黏膜炎症以及肠黏膜上皮细胞的凋亡等。

本实验研究结果发现,脾肾阳虚型 UC 模型组大鼠血清及结肠组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 的含量与空白组相比较明显升高,随着时间的延长,炎症越发严重。如上所述,促炎性细胞因子 IL-1、

IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 通过免疫上调和促进炎症活性而加重肠道黏膜的炎性反应和组织损伤,在大鼠 UC 模型的发生、发展过程中可能起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Ahuja V, Tandon R K. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area; a comparison with developed countries and regional differences [J]. *J Digest Dis*, 2010, 11(3): 134 - 147.
- [2] Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): 514 - 521.
- [3] 沈建法, 刘庆宪. 溃疡性结肠炎发生的藏象学基础 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(10): 2206 - 2208.
- [4] 岳宏, 王天芳, 陈剑明, 等. 溃疡性结肠炎常见中医证候及证候要素的现代文献研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(5): 306 - 308.
- [5] 陈贤坤, 王立峰, 赵慧, 等. 强肌健力方对脾肾两虚大鼠细胞因子水平的影响 [J]. *放射免疫学杂志*, 2010, 23(3): 282 - 283.
- [6] 赵海梅, 刘端勇, 汤菲, 等. 四神丸对小鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜修复的保护机制研究 [J]. *中成药*, 2009, 31(12): 1935 - 1937.
- [7] 周攻. 非特异性溃疡性结肠炎中西医结合诊治研究进展 [J]. *中西医结合杂志*, 1988, 8(3): 184.
- [8] Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach [J]. *Pharmacol Rev*, 2003, 55(2): 241 - 269.
- [9] Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, et al. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation [J]. *J Immunol*, 1995, 154(5): 2434 - 2440.
- [10] Holtkamp W, Stollberg T, Reis HE. Serum interleukin-6 is related to disease activity but not disease specificity in inflammatory bowel disease [J]. *J Clin Gastroenterol*, 1995, 20(2): 123.
- [11] Indaram AV, Visvalingam V, Locke M, et al. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95: 1221 - 1225.
- [12] 张志军, 王磊, 蒋晓云, 等. TLR4mAb 对急性期溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜中促炎因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 的影响 [J]. *复旦学报*, 2008, 35(2): 176 - 180.

[收稿日期] 2014-10-27