

海螵蛸多糖 CPS-1 对小鼠实验性溃疡性结肠炎作用的初步观察

魏江洲,张建鹏,刘军华,徐红丽,冯伟华*,焦炳华*
(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨海螵蛸多糖相对均一组分——CPS-1 对小鼠实验性溃疡性结肠炎(UC)的保护作用。**方法:**采用 DSS 诱导法建立小鼠 UC 模型,以 SMZ-TMP 为对照,通过临床症状、体质量改变、局部肠黏膜(溃疡发生)改变情况等指标对高、低剂量 CPS-1 对 UC 小鼠的保护作用进行初步观察。并采用 ELISA 方法测定了小鼠血清中某些内皮增殖及炎症相关的细胞因子的含量变化。**结果:**海螵蛸多糖治疗组小鼠模型建立后的体质量没有明显降低,小鼠的一般生长情况都良好,血清中 EGF 和 PDGF 的含量较模型建立前明显增加,而 TNF- α 的含量与阳性对照组相比则明显降低($P<0.05$)。**结论:**海螵蛸多糖 CPS-1 能够明显的提高 UC 小鼠血液中 EGF 和 PDGF 的含量,加速溃疡组织的愈合;同时降低 TNF- α 的表达,从而缓解炎症。因此,海螵蛸多糖 CPS-1 能够加速溃疡组织的愈合和修复过程。

[关键词] 海螵蛸;多糖类;结肠炎,溃疡性

[中图分类号] R 282.77; R 574.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0028-03

Effects of Cuttlebone polysaccharide CPS-1 on experimental ulcerative colitis in mice

WEI Jiang-zhou, ZHANG Jian-peng, LIU Jun-hua, XU Hong-li, FENG Wei-hua*, JIAO Bing-hua* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:**To study the protective effects of cuttlebone polysaccharide CPS-1 on experimental ulcerative colitis (UC) in mice. **Methods:** Dextran sodium sulfate (DSS) was used to induce UC in mice and mice treated with SMP+TMP were taken as control. The protective effects of cuttlebone polysaccharide CPS-1 (high and low dose) on experimental UC in mice were evaluated with clinical symptoms, body weight changes and pathological changes in local intestinal mucous membrane. Cytokines related to endothelial cell proliferation and inflammation were determined in mice serum using ELISA kits. **Results:** There was no obvious change in body weight in mice treated with CPS-1 and the mice were well alive. Serum EGF and PDGF in CPS-1 treated mice were obviously increased compared with those in normal mice, while serum TNF- α in CPS-1 treated mice was significantly lower than that of positive control mice($P<0.05$). **Conclusion:** Cuttlebone polysaccharide CPS-1 can obviously increase EGF and PDGF levels in experimental UC mice and accelerate the conrescence and repair of ulcer. Meanwhile, it can also decrease the expression of TNF- α and relieve inflammation.

[KEY WORDS] cuttlebone; polysaccharides; colitis, ulcerative

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 28-30]

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 简称溃结, 是一种较常见的肠道慢性炎症性疾病, 临床以反复发作、迁延不愈的腹痛腹泻、黏液或脓血便为特征, 无特效治疗方法。近年来溃结发病率有逐年增高的趋势^[1], 其病因和发病机制尚不清楚, 一些研究表明, 其发病可能与免疫、感染、遗传等因素有关^[1,2]。

近年来, 随着糖生物学的迅速发展, 一些天然活性多糖也开始被用于消化道溃疡的治疗药物研究。海螵蛸, 又名乌贼骨, 是海洋动物无针乌贼 (*Sepiella maindroni de Rochelbrune*) 或金乌贼 (*Sepia esculenta Hoyle*) 的干燥内壳, 为传统中药材^[3]。其性咸、涩、温, 有收敛止血、涩精止带、制酸、敛疮等作用, 应用广泛。乌贼骨在临床多用于治疗各种溃疡, 具有很好的疗效^[4~6]。本实验室利用多糖分离纯化

平台^[7]从东海曼氏无针乌贼 (由浙江海洋学院海洋生物教研室赵盛龙教授鉴定) 的骨状内壳中分离得到海螵蛸多糖相对均一组分——CPS-1^[8], 观察其对实验性 UC 小鼠的保护作用, 试图从多糖的角度探讨传统海洋中药材海螵蛸的药用机制。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂及仪器 海螵蛸多糖 CPS-1 由本课题组自制 (相对分子质量约为 1.1×10^8), BALB/

[基金项目] 国家重点科技攻关计划 (96-C-02-01-12); 浙江省科技计划项目 (2005ZJKJJH2202). Supported by National Key Scientific and Technological Research Program (96-C-02-01-12) and Zhejiang Science and Technology Research Program (2005ZJKJJH2202).

[作者简介] 魏江洲, 硕士. E-mail: smmufalcon@126.com

* Corresponding author. E-mail: fwh402@163.com; Jiaobh@uninet.com.cn

c 小鼠,雌雄各半,购于第二军医大学实验动物中心,9 周龄,体质量约(25±2) g。葡聚糖硫酸钠(DSS)为 Sigma 公司产品,小鼠内皮生长因子(EGF) ELISA 检测试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子 α(TNF-α)ELISA 检测试剂盒及小鼠血小板衍生生长因子(PDGF)ELISA 检测试剂盒均购自上海西唐生物公司,肝素钠注射液由第二军医大学长海医院提供。Bio-Rad 680 型酶标仪(Bio-Rad 公司),Beckman 台式高速离心机(Beckman 公司)。

1.2 小鼠实验性 UC 模型的建立 参照文献[9]方法进行,将 5% DSS(Sigma 公司,相对分子质量 5 000)水溶液给小鼠自由饮用 7 d,再改为蒸馏水自由饮用 10 d,即进入 UC 的急性期。

30 只 BALB/c 模型小鼠随机分为 5 组,每组 6 只,分别为:(1)空白对照组,为正常健康小鼠,不诱导 UC,正常饲养,每天腹腔注射 0.1 ml 生理盐水;(2)阴性对照组,诱导 UC,不进行药物治疗,从饮用 DSS 溶液的第 3 天开始每天腹腔注射 0.1 ml 生理盐水;(3)阳性对照组,从饮用 DSS 溶液的第 3 天开始每天腹腔注射 0.1 ml SMZ+TMP(2.5 mg/ml),连续 7 d;(4)CPS-1 低剂量组,从饮用 DSS 溶液的第 3 天开始每天注射 2 mg/ml CPS-1 0.1 ml,连续 7 d;(6) CPS-1 高剂量组,从饮用 DSS 溶液的第 3 天开始每天注射 5 mg/ml CPS-1 0.1 ml,连续 7 d。对所有实验小鼠提供相同的饲养条件。

1.3 CPS-1 对实验性 UC 小鼠的保护作用

1.3.1 一般情况观察 饮用 DSS 溶液第 2 天起每天作大便隐血试验,并观察腹泻及肉眼血便情况。模型建立后对每组小鼠分别称重,与模型建立前的体质量进行比较。

1.3.2 实体显微镜检查 模型建立后,将小鼠颈椎脱臼法处死。打开腹腔,分离出全结肠,置于 D-Hanks 液中。沿肠系膜附着部剪开肠壁,肠内容物冲洗干净后在滤纸上将肠壁展开,甲苯胺蓝染色后置实体显微镜下观察肠黏膜的改变。

1.3.3 血中 EGF、TNF-α、PDGF 含量的测定 每组小鼠进行眼眶取血 0.2 ml,加入肝素钠,离心后分离得到血清标本备用。使用小鼠 ELISA 试剂盒对血清样品中的 EGF、TNF-α、PDGF 含量进行定量检测。酶标仪读板后结果通过标准曲线计算出每种细胞因子的含量,并用统计学方法进行误差分析和显著性差异分析。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 8.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结 果

2.1 UC 小鼠一般情况的观察 阴性对照组、阳性对照组和 CPS-1 低剂量组的小鼠饮用 DSS 后,均在第 4 天出现腹泻症状,隐血试验为阳性,第 6 天均出现不同程度的肉眼血便。CPS-1 高剂量组和空白组小鼠并未出现明显的血便及腹泻症状。如表 1 所示。

表 1 实验不同时期的小鼠体质量
Tab 1 Body mass of mice at different time points during experiment

Group	Body weight	
	Before experiment	After experiment
Blank	25.21±0.56	35.15±0.23
Negative control	25.62±0.13 *	24.47±0.63 *
Positive control	24.86±0.37 *	30.84±0.85 *
CPS-1(Low dose)	24.79±0.59 **	23.57±0.76 **
CPS-1(High dose)	25.53±0.22 [△]	33.11±0.74 [△]

* *P*<0.05, ** *P*<0.01 vs blank group; [△]*P*<0.05 vs negative control group

从表 1 可看出,高剂量 CPS-1 治疗组的小鼠体质量在模型建立后并没有明显的降低,与空白组相当,而阴性对照组的小鼠体质量则在模型建立后有降低趋势。这说明海螵蛸多糖 CPS-1 能够减少 UC 对实验小鼠体质量的减轻作用。

2.2 UC 小鼠实体显微镜检查 实体显微镜下可见阴性对照组肠黏膜广泛充血、水肿,局部有糜烂、出血,并可找到明显的溃疡灶,尤其以下半段结肠显著。阳性对照组、CPS-1 低剂量组的肠黏膜溃烂程度相对不高,明显的溃疡灶并不发生在组内每只动物身上。而空白组和 CPS-1 高剂量组的肠黏膜轻微溃烂,偶尔有明显的溃疡灶出现。

2.3 UC 小鼠血清细胞因子的表达水平 实验后各组小鼠血清经 ELISA 法检测的 EGF、PDGF、TNF-α 的含量如表 2 所示。结果表明海螵蛸多糖 CPS-1 能够明显提高 UC 小鼠血液中 EGF 和 PDGF 的表达水平,而 TNF-α 的表达水平却有所下降(*P*<0.05)。

表 2 各组小鼠血清中 EGF、PDGF、TNF-α 的含量
Tab 2 Contents of EGF,PDGF,TNF-α in mice serum in all groups

(n=6, $\bar{x} \pm s$, $\rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)			
Group	EGF	PDGF	TNF- α
Blank	141.4 $\pm$ 5.42	56.65 $\pm$ 6.21	27.23 $\pm$ 4.36
Positive control	135.2 $\pm$ 7.38 *	64.34 $\pm$ 4.91 *	43.74 $\pm$ 7.26 *
Negative control	165.6 $\pm$ 3.47 *	72.23 $\pm$ 5.38 *	52.21 $\pm$ 5.67 *
CPS-1(low dose)	174.8 $\pm$ 2.21 *	68.54 $\pm$ 7.15 *	34.86 $\pm$ 3.79 *
CPS-1(high dose)	178.2 $\pm$ 6.33	77.24 $\pm$ 3.98	27.34 $\pm$ 5.25

* $P<0.05$ vs blank group; $\Delta P<0.05$ vs positive control group

3 讨 论

研究表明,DSS 诱导的小鼠结肠炎模型的肠道病变与人类 UC 相似^[10],故多被用于 UC 动物模型研究^[9,11]。本研究结果表明,注射海螵蛸多糖 CPS-1 的小鼠在饮用 DSS 诱导 UC 后,能够保持良好的精神状态,少有便血现象;同时,CPS-1 能够明显提高 UC 小鼠血液中 EGF 和 PDGF 的表达水平,降低 TNF- α 的表达水平。提示 CPS-1 可以通过促进 EGF 和 PDGF 的表达来加速溃疡组织的愈合,并且能够降低 TNF- α 的表达,从而减少炎症的发生。

创伤修复是一个很复杂的生物学过程,创伤部位的多样性和合成活性由各种生长因子调节。在形成血管组织中,创伤诱导血液凝集,血小板失去颗粒,释放 PDGF、EGF 等生长因子,启动修复的过程。EGF 是哺乳动物体内的重要生长因子之一,能启动 DNA 合成,激活细胞外大分子、蛋白质、RNA 的合成,通过激活靶细胞上的 EGF 受体酪氨酸激酶的活性,对多种组织来源的上皮细胞都有很强的促分裂和增殖活性,可加快上皮细胞再生速度。PDGF 是中性粒细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞等的趋化因子,征集这些细胞进入损伤区域并高浓度表达,此外 PDGF 是重要的促有丝分裂原,能够直接作用于成纤维细胞和肌成纤维细胞等组织修复细胞,加速细胞增殖,促进伤口愈合。TNF- α 是体内重要的炎症因子,也是溃疡炎症程度的标志细胞因子,能够激活 NF- κ B 的表达,从而导致炎症^[12,13]。

EGF 表达的增加有助于溃疡组织的愈合,PDGF 同样对溃疡组织的修复起到积极作用,而 TNF- α 的表达水平一直是溃疡组织炎症程度的标

志性细胞因子^[14]。可以看出,海螵蛸多糖 CPS-1 能够对溃疡组织愈合起到积极的作用,一方面促进 EGF 和 PDGF 的表达,加快细胞修复过程,另一方面,抑制 TNF- α 的表达,从而缓解炎症的严重程度。

总之,本实验表明海螵蛸多糖 CPS-1 对 UC 具有潜在的治疗作用,也从糖生物学的角度初步重新阐明了海螵蛸作为溃疡用药的药物作用机制。CPS-1 的结构还有待于进一步确定,基因表达水平或者蛋白质表达水平的研究也有待进行。

[参 考 文 献]

[1] 郑红斌. 溃疡性结肠炎全球发病情况比较[J]. 中华消化杂志, 2001,21:242-243.

[2] Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics[J]. Gastroenterology, 2001,120:622-635.

[3] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 207.

[4] 方尔笠, 顾 洛, 田苏平. 海螵蛸防治胃溃疡的机理探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 1994,14:101-103.

[5] 田朝阳, 李雪霜. 乌贼骨的新用浅析[J]. 中医药信息, 2001,18: 25.

[6] 赵云涛, 李 琨, 黄 燕, 等. 海螵蛸入药部分和废弃部分 8 种无机元素分析[J]. 微量元素与健康研究, 2003,20:26-27.

[7] 姚 滢, 魏江洲, 王 俊, 等. 厚壳贻贝多糖的提取和免疫学活性研究[J]. 第二军医大学学报, 2005,26:896-899.

[8] 魏江洲, 张建鹏, 刘军华, 等. 海螵蛸多糖的提取分离及活性组分 CPS-1 的纯化[J]. 第二军医大学学报, 2006,27:17-21.

[9] 王群英, 陈村龙, 王继德. 葡聚糖硫酸钠致小鼠溃疡性结肠炎的模型建立[J]. 第一军医大学学报, 2002,22:608-610.

[10] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice[J]. Gastroenterology, 1990,98:694-702.

[11] 胡仁伟, 欧阳钦, 陈代云. 右旋葡聚糖硫酸钠小鼠溃疡性结肠炎动物模型建立方法探讨[J]. 胃肠病学, 2002,7:331-334.

[12] 卢艺涛, 高 静, 姚桂琴. 溃疡性结肠炎患者相关细胞因子的实验性研究[J]. 现代预防医学, 2005,32:735-736.

[13] 李 岩. 炎症肠病动物模型分类与其发病机制研究进展[J]. 国外医学·消化系疾病分册, 2003,23:267-270.

[14] Ker YB, Chen KC, Chyau CC, et al. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei mycelia*[J]. J Agric Food Chem, 2005,53:7052-7058.

[收稿日期] 2005-10-17 [修回日期] 2005-12-15
[本文编辑] 邓晓群