

柴黄胃溃宁对肝郁脾虚证胃溃疡模型大鼠脾 IL-6、TNF- α mRNA 表达的影响

邓金钗, 郑小伟, 余王琴, 徐丹妮, 杨梓, 许诺, 刘晓谷

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

[摘要] 目的: 探讨柴黄胃溃宁对肝郁脾虚证胃溃疡脾脏中 IL-6 mRNA 和 TNF- α mRNA 表达的影响和可能疗效机制。方法: 40 只大鼠随机取 10 只作为空白组, 其余 30 只按多因素复合模拟中医病因结合乙酸法建立模型, 造模 2 周后, 随机分为模型组、柴黄胃溃宁组和法莫替丁组, 各 10 只, 连续灌胃给药 14 天。用 HE 染色观察大鼠胃窦部溃疡的病理学改变, 采用 RT-PCR 技术检测脾脏中 IL-6 mRNA 和 TNF- α mRNA 表达水平。结果: 模型组大鼠血清去甲肾上腺素水平较空白组升高, 5-羟色胺、D-木糖、胃泌素水平较空白组下降 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组 TNF- α mRNA 升高 ($P < 0.01$), IL-6 mRNA 升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 柴黄胃溃宁组 TNF- α mRNA 降低 ($P < 0.01$), IL-6 mRNA 升高; 法莫替丁组 TNF- α mRNA、IL-6 mRNA 均降低 ($P < 0.01$)。结论: 柴黄胃溃宁通过下调 TNF- α mRNA 和升高 IL-6 mRNA 水平调节肝郁脾虚证胃溃疡模型大鼠免疫功能。

[关键词] 胃溃疡; 肝郁脾虚证; 柴黄胃溃宁; IL-6 mRNA; TNF- α mRNA

[中图分类号] R573.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 11-0205-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.11.081

胃溃疡主要是指发生在胃部的慢性溃疡, 是最常见的一种消化系统疾病。归属于中医学胃痛、吐酸等范畴。胃溃疡多因饮食不节、生活无规律、情志刺激导致肝胃不和、脾胃损伤而发病, 临床上以肝郁脾虚证较为多见, 与机体免疫功能关系密切。本实验拟通过建立肝郁脾虚证胃溃疡大鼠模型, 并分别采用中医验方柴黄胃溃宁和法莫替丁对其干预, 比较观察中西药物对大鼠脾脏中白细胞介素-1 β (IL-1 β) mRNA 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 水平的影响, 以探讨柴黄胃溃宁对胃溃疡免疫功能的调节机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 40 只, 体重(180 \pm 10) g, 由浙江中医药大学动物实验研究中心提供, 动物合格证: SCXK(沪)2008-0016。

1.2 试剂和仪器 Trizol(Invitrogen 公司, 批号 14105), 反转录试剂盒[大连宝生物(大连), RR036A], Taq 酶[大连宝生物(大连), RR820A], 紫外分光光度计(美国 Amersham 生物技术公司, 型号: Ultrospec S300 pro); Real-time PCR 仪(美国, Bio Rad 公司, 型号: iQ5)。

1.3 药物制备 大黄制剂: 生大黄粉加水制成 100% 溶液, 50 $^{\circ}$ C 水浴 6 h, 去渣取汁; 柴黄胃溃宁: 黄芪、柴胡、虎杖根、香附、党参各 12 g, 芍药 18 g, 桂枝、生姜各 9 g, 生甘

草 6 g, 大枣 4 枚, 饴糖 30 g。中药常规煎煮后浓缩成含生药 4.8 g/mL 的煎液, 相当于成人剂量的 16 倍; 法莫替丁(白云山制药): 将药片研碎, 用生理盐水配制成 2.7 mg/mL 的混悬液。以上药品均购自浙江中医药大学中医门诊部。

1.4 引物编码序列 由上海生物工程技术服务有限公司合成。TNF- α , F: 5'-TCGTCTACTCCTCAGAGCCC-3', R: 5'-ACTTCAGCGTCTCGTGTGTT-3', 产物 128bp; IL-6, F: 5'-GCCACTGCCTTCCCTACTTC-3', R: 5'-TTCTGACAGTGCATCATCGCT-3', 产物 192bp; GAPDH, F: 5'-AAGATGTGAAGGTCGGTGTG-3', R: 5'-AAGAGAAGGCAGCCCTGTGA-3', 产物 70 bp。

2 方法

2.1 造模、分组和给药 40 只大鼠随机取 10 只作为空白组, 余 30 只按多因素复合模拟中医病因结合乙酸法建立模型^[1], 造模 2 周后, 随机分为模型组、柴黄胃溃宁组和法莫替丁组。各 10 只, 连续灌胃给药 14 天, 空白组和模型组予生理盐水, 柴黄胃溃宁组和法莫替丁组给予相应药物, 每只 3 mL, 每天 1 次。

2.2 标本采集和处理 末次给药后禁食 24 h, 麻醉, 剖腹取胃, 沿胃大弯剪开, 用纯净水冲洗干净, 放入 10% 甲醛溶液以制备病理切片; 取脾, 纯净水洗去表面血液, 放入冻存管,

[收稿日期] 2014-05-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072755); 浙江中医药大学校级科研基金项目(编号: 2012ZR02); 浙江省研究生科研创新项目(编号: YK2011076)

[作者简介] 邓金钗(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 消化和呼吸系统病。

[通讯作者] 刘晓谷, E-mail: liuxiaogu@126.com。

存于超低温冰箱中备用。采用酶联免疫法检测 5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)、采用间苯三酚法,由波长为 554 nm 的 722 光栅分光光度计测定 D-木糖、采用放射免疫法(竞争抑制法)检测血清胃泌素(GAS)。

2.3 复建模型评价 大白鼠肝郁脾虚证主要症状^[1]:精神萎靡,毛枯黄无华,食欲不振,大便软溏,易激惹。实验室指标:脾虚证血清和尿木糖排泄率降低;肝郁证血清 5-HT 水平减低。胃溃疡:病理切片有溃疡性改变。

2.4 RT-PCR 检测方法 将取材好的脾脏约 100 mg 研磨成粉末状,加入 1 mL Trizol,提取核糖核酸(RNA)。经 37℃15 min, 85℃5 s 逆转录出脱氧核糖核酸(cDNA)。检测脾脏中 IL-6 mRNA 和 TNF- α mRNA 表达。反应条件为:在“95℃30s-95℃5s-60℃30s, 41 个循环”的条件下将反应液扩增;运用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 计算基因相对表达量。

2.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,数值以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,比较用 t 检验。

3 结果

3.1 一般情况 造模期间,空白组大鼠动作自如,饮食如常,大便成形,皮毛密泽紧贴,体重逐渐增加。模型组大鼠易激惹或精神倦怠,摄食减少,便溏,毛发枯黄,体重增长缓慢或下降。

3.2 空白组、模型组大鼠肝郁脾虚证相关指标比较 见表 1。模型组大鼠血清 NE 水平较空白组升高,5-HT、D-木糖、GAS 水平较空白组下降($P < 0.05$)。

表 1 空白组、模型组大鼠肝郁脾虚证相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	NE(pg/mL)	5-HT(ng/mL)	D-木糖(mmol/L)	GAS(pg/mL)
空白组	196.08±6.83	186.57±5.99	0.13±0.03	27.80±1.50
模型组	234.95±19.43	157.20±15.39	0.05±0.03	16.69±4.50

与空白组比较,① $P < 0.05$

3.3 胃窦部 HE 染色病理学结果 空白组胃黏膜结构完整,肌层组织整齐,胞质、间质及纹理排列正常;模型组胃黏膜缺损,表面炎性坏死、充血,炎症细胞浸润、纤维素渗出、部分肌质纤维溶解等病变表现。用药组黏膜下肉芽组织增生,毛细血管丰富,边缘新生腺体不规则囊状扩张。见图 1。

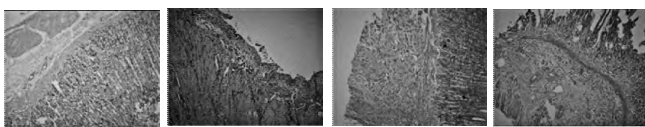


图 1 各组大鼠胃组织 HE 染色结果

3.4 各组脾组织中 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达比较 见表 2。与空白组比较,模型组 TNF- α mRNA 升高($P < 0.01$), IL-6 mRNA 升高($P < 0.05$)。与模型组比较,柴黄胃溃宁组 TNF- α mRNA 降低($P < 0.01$), IL-6 mRNA 升高;法莫替丁

组 TNF- α mRNA、IL-6 mRNA 均降低($P < 0.01$)。

表 2 各组脾组织中 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α mRNA	IL-6 mRNA
空白组	1.595 8 ± 1.583 42	1.085 7 ± 0.505 37
模型组	6.768 1 ± 2.611 62	1.519 1 ± 0.590 65
柴黄胃溃宁组	2.062 5 ± 1.020 98	1.874 1 ± 0.682 17
法莫替丁组	2.742 7 ± 3.478 26	0.956 6 ± 0.507 07

与空白组比较,① $P < 0.01$, ② $P < 0.05$;与模型组比较,③ $P < 0.01$, ④ $P < 0.05$

4 讨论

胃溃疡主要症状为饥饿不适、嗝气、泛酸或慢性、周期性腹痛,其病位在胃,基本病机是木郁土虚。脾胃在纳运水谷,脾升清胃降浊,濡养机体,排泄糟粕。脾胃五行属土,肝属木,它们生理相关,病理相连。一方面,脾胃的正常升降有赖于肝的调达疏泄,一方面脾胃易被肝克。饮食失调、忧思焦虑常损伤脾胃;肝气郁结,横逆犯胃,常易发生本病。胃溃疡及肝郁脾虚证多伴有免疫功能低下,本实验拟研究肝郁脾虚证胃溃疡大鼠的免疫功能状况,探讨柴黄胃溃宁的免疫调节机制。

TNF- α 是一种主要由巨噬细胞产生的重要免疫调节因子,在外伤、炎症等应激条件下 TNF- α 产生增加,具有双重生物学作用:一方面适当的增加对机体起免疫保护作用;另一方面过度升高可诱导其它细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8 等)产生,造成组织损伤^[2]。IL-6 是活化的 T 细胞和成纤维细胞产生的淋巴因子,可促进 B 细胞产生抗体,并具有调节免疫应答、抗感染防御,参与机体炎症反应等广泛的生物学活性。IL-6 可在 TNF- α 的诱导下产生,而 IL-6 又可反作用于巨噬细胞,抑制 TNF- α 的合成产生更为有效的保护效应^[3-4]。

本研究结果提示,模型组 TNF- α ($P < 0.01$)、IL-6 ($P < 0.05$) 基因水平较空白组升高,并且模型组胃窦部 HE 染色出现溃疡和炎症表现,可以确定 TNF- α 和 IL-6 作为炎症因子参与肝郁脾虚证胃溃疡病理损伤的发生。给药后, TNF- α 水平显著下调($P < 0.01$, $P < 0.05$),说明柴黄胃溃宁和法莫替丁通过抑制 TNF- α 的表达,减轻炎症反应,促进免疫功能的恢复;IL-6 的水平在肝郁脾虚组略升高,在法莫替丁组降低($P < 0.01$),结合各组胃溃疡 HE 染色结果,笔者推断,柴黄胃溃宁可能通过升高 IL-6 水平,一方面直接发挥 IL-6 的抗感染作用,另一方面通过抑制 TNF- α 的合成而减轻炎症反应。

柴黄胃溃宁是以黄芪建中汤(黄芪、桂枝、白芍、炙甘草、大枣、生姜、饴糖)为基础,加入疏肝理气之柴胡、香附,健脾补气之党参,促进溃疡修复之虎杖根,共奏温中补脾,疏肝解郁之效,标本兼顾。现代研究证实黄芪建中汤和柴胡都具有保护胃黏膜和增强免疫力的作用^[5-6]。

[参考文献]

- [1] 郑小伟, 王颖, 宋红. 补中益气汤对脾气虚证大鼠血清胃泌素影响的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(7): 393-396.
- [2] Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action[J]. Am J Physiol, 1992, 263(1): C1-16.
- [3] Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(10): 734.
- [4] Morganti Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, et al. Pole of cerebral inflammation after traumatic brain injury: are visited concept[J]. Shock, 2001, 16(3): 165.
- [5] 王红伟, 蒋时红, 刘旺根. 黄芪建中汤对脾虚型慢性萎缩性胃炎大鼠免疫功能的影响[J]. 河南中医, 2006, 26(8): 25-27.
- [6] 史青, 聂淑琴, 黄璐琦. 柴胡属植物化学成分及药理研究新进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 8(5): 53-56.

(责任编辑: 马力)

◆ 针灸研究论著 ◆

益气祛瘀涤痰汤联合醒脑开窍针刺法治疗中风患者临床观察

秦笛, 刘星

中国石油天然气集团公司中心医院, 河北 廊坊 065000

[摘要] 目的: 观察益气祛瘀涤痰汤联合醒脑开窍针刺法治疗中风的临床疗效。方法: 将 170 例中风患者随机分为 2 组各 85 例, 对照组给予基础性药物治疗, 观察组在药物治疗的基础上加用益气祛瘀涤痰汤联合醒脑开窍针刺法治疗。治疗 1 月为 1 疗程, 治疗 2 疗程后比较 2 组血脂 [总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)] 水平, 神经缺损功能评分和住院期间脑血管事件发生率的情况。结果: 治疗后, 观察组患者 TC、TG、LDL-C 低于对照组, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 而 HDL-C 水平高于对照组, 差异亦有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。治疗后, 观察组患者神经功能缺损评分低于对照组, 差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。住院期间脑血管事件的发生率低于对照组, 差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。结论: 应用益气祛瘀涤痰汤联合醒脑开窍针刺法治疗中风可以有效改善其血液指标和神经功能缺损情况, 并减少脑血管事件的发生。

[关键词] 中风; 醒脑开窍针刺法; 益气祛瘀涤痰汤; 神经功能缺损; 总胆固醇 (TC); 甘油三酯 (TG); 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C); 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 0256-7415 (2014) 11-0207-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.11.082

Clinical Observation of Stroke Patients Treated by Decoction with Actions of Nourishing Qi to Expelling Phlegm and Removing Stasis Combined with Resuscitation-inducing Acupuncture Therapy

QIN Di, LIU Xing

Abstract: Objective: To study the clinical effect and adverse action of the decoction with the actions of nourishing qi to

[收稿日期] 2014-06-14

[基金项目] 河北省科技技术成果项目 (编号: 2012013078)

[作者简介] 秦笛 (1978-), 女, 医学硕士, 主治医师, 主要从事中医内科学临床工作。