

- [2] Arturo Rodriguez- Hernandez, Ivan Rubio- Gayosso, Israel Ramirez, et al. Intraluminal- restricted 17 $\beta$ -estradiol exerts the same myocardial protection against ischemia/reperfusion injury in vivo as free 17 $\beta$ -estradiol[J]. Steroids, 2008, 73(1): 528- 538.
- [3] 汤健, 周爱儒. 心血管分子生物学[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 108- 114.
- [4] Lei- Lei Chen, Hang Yin, Jun Huang. Inhibition of TGF-  $\beta$  1 signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis [J]. Cardiovascular Pathology, 2007, 16(4): 221- 230.

(责任编辑: 骆欢欢)

## 辛开苦降法抗大鼠应激性胃黏膜损伤的作用机制研究

郭春秀, 聂娅, 黎鹏程, 梁媛, 谭达全

湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007

**[摘要]** 目的: 观察预先给予辛开苦降的代表方半夏泻心汤对水浸束缚应激大鼠胃黏膜表皮生长因子 (EGF)、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 含量的影响。方法: SD 大鼠随机分为空白组、模型组、中药组 (半夏泻心汤)、西药组 (奥美拉唑)。每组动物相应药物灌胃 3 天。除空白组外, 其他大鼠水浸束缚应激 (WRS) 造模。计算大鼠胃黏膜损伤指数 (UI), HE 染色光镜下观察大鼠胃黏膜病理改变, 酶联免疫法检测各组大鼠胃黏膜中 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜肉眼、光镜观察病理改变明显, 模型组大鼠 UI 最高, 与空白组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示造模成功; 与模型组比较, 中药组和西药组 UI 均降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与空白组比较, 模型组 EGF 含量升高, PGE<sub>2</sub> 含量显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 中药组和西药组可显著升高胃黏膜中 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 中药组胃黏膜中 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量低于西药组 ( $P < 0.05$ )。结论: 辛开苦降的半夏泻心汤可显著对抗应激性胃黏膜损伤, 其抗损伤发生的机制之一可能是通过升高胃黏膜中 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量, 增强对胃黏膜保护作用。

**[关键词]** 应激性胃黏膜损伤; 辛开苦降法; 半夏泻心汤; 表皮生长因子 (EGF); 前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

**[中图分类号]** R573 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256- 7415 (2015) 05- 0270- 04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.05.128

应激性溃疡是机体在遭受严重的身体和心理障碍等应激状态时, 发生的一种以炎性糜烂、浅表性溃疡及胃肠道出血为特征的急性胃黏膜病变。中医学认为, 心理应激属于情志致病范畴, 引发脏腑气机失调是其致病的重要特点, 所以防治的关键是调理脾胃中焦气机, 使全身枢纽协调通畅。斡旋脾胃气机的代表方就是辛开苦降法之半夏泻心汤, 研究证实其可有效地预防应激性溃疡的发生。胃黏膜的急性损伤主要是由于胃黏膜的保护因子和攻击因子失去平衡。因此如何调整胃黏膜保护因子与攻击因子的平衡, 改善胃黏膜上皮细胞的生存环境, 对抗应激状态下胃黏膜损伤的发生, 是预防应激性胃黏膜损伤发生的关键。

### 1 材料与方法

1.1 动物分组及处理 健康 SD 大鼠 40 只, 雄性, 体重 180~220 g, 购自湖南斯莱克景达生物有限责任公司, 动物合格证号: SCXK(湘)2011- 0003。40 只大鼠按随机数字表法随机分为 4 组: 空白组、模型组、中药组、西药组, 每组 10 只。实验程序经湖南中医药大学实验动物中心动物伦理委员会批准。4 组动物于实验前饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 适应性饲养 1 周, 控制室温 (25 $\pm$  2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (65 $\pm$  5)% , 饲养条件相同。中药组给予半夏泻心汤药液按照 1 mL/100 g 灌胃; 西药组给予奥美拉唑 1 mL/100 g 灌胃; 空白组和模型组以等量生理盐水灌胃处理。均每天 1 次, 持续 3

**[收稿日期]** 2014-11-01

**[基金项目]** 湖南省中医药管理局资助项目 (2012038); 湖南省教育厅资助项目 (14C0868); 湖南中医药大学中医基础理论校级重点学科资助

**[作者简介]** 郭春秀 (1979-), 女, 讲师, 研究方向: 中医治则与治法研究。

**[通讯作者]** 谭达全, E-mail: gcxu2005@126.com。

天。除空白组外,中药组、西药组、模型组大鼠采用水浸束缚应激法(water immersion and restraint stress, WRS)<sup>[1]</sup>制作急性胃溃疡模型。大鼠禁食不禁水 24h,将大鼠仰卧捆绑固定于鼠板上,然后将鼠板直立于(20±1)°C的水箱中,水面平大鼠胸骨剑突水平,水浸 10 h 后大鼠取出松绑。

1.2 药品 半夏泻心汤所用中药(半夏、黄芩、黄连、干姜、人参、炙甘草、大枣)均一次性购自湖南楚仁堂大药房,经湖南中医药大学中药教研室专家鉴定为正品。药物剂量比例按《伤寒论》原著:半夏半升,黄芩、黄连、人参、炙甘草各三两,黄连一两,大枣十二枚。根据文献[2]换算为现代用量,半夏 55.7 g,黄芩、干姜、人参、炙甘草各 46.9 g,黄连 15.6 g,大枣 42.0g。依据人单位体重生药量(60 kg)换算得大鼠单位体重(200 g)生药量。药物水煎 30 min,2 次,提取水煎液,合并,水浴加热浓缩至所需量,贮于冰箱中备用。奥美拉唑,北京康蒂尼药业有限公司生产,规格:20 mg/片,批准文号:国药准字 H20031216,购于湖南老百姓大药房。实验时依人用药量换算成大鼠用药量,根据灌胃量,以生理盐水稀释成所需浓度。

1.3 仪器与设备 PW-812 多功能全自动酶标洗板机(深圳汇松科技有限公司);MB-530 酶标仪(深圳汇松科技有限公司);TGL 16M 台式高速冷冻离心机(长沙科威实业有限公司);ES-C600 电子天平(长沙湘仪天平仪器厂);DK-8D 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.4 胃黏膜损伤指数(UI)检测 造模后,所有大鼠 10%水合氯醛麻醉仰卧固定于鼠板上,剖腹腹腔静脉采血,取胃。沿胃大弯剖开,用生理盐水冲洗干净,再用毛笔轻轻刷去胃黏膜表面黏液,在滤纸上平展开,10 倍放大镜下肉眼观察大鼠的胃黏膜损伤情况,按文献[1]:斑点糜烂长度≤1 mm 计 1 分;1 mm<长度≤2 mm 计 2 分;2 mm<长度≤3 mm 计 3 分;3 mm<长度≤4 mm 计 4 分;长度>4 mm 计 5 分;宽度≥2

mm 者计分加倍,累计所得损伤指数。

1.5 ELISA 法检测胃黏膜表皮生长因子(EGF)、前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)含量 所有动物摘下全胃,沿胃大弯剖开,用生理盐水冲洗,取一部分胃组织称重,按 1.5 mL/400 mg 比例加入生理盐水,用玻璃匀浆器研磨,制成胃黏膜组织匀浆,4°C,离心半径 8cm,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,-20°C 低温保存。从冰箱取出试剂盒和样品在室温平衡 20 min;取出板条,设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL;待测样本孔先加生物素 10 μL,再加待测样本 50 μL;随后标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100 μL,用封板膜封住反应孔,37°C 水浴锅或恒温箱温育 60 min;弃去液体,在吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干,如此重复洗板 5 次(也可用全自动酶标洗板机洗板)。每孔加入底物 A、B 各 50 μL,37°C 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μL,15 min 内,在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值;在 Excel 表中,以标准品浓度作为横坐标,以对应 OD 值作为纵坐标,绘制标准品线性回归曲线,按曲线方程计算出各样本的浓度值。

1.6 统计学方法 采用 SPSS16.0 软件进行分析,计量资料数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示。正态性检验,若符合正态分布者,多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者用 LSD 和 SNK 法,若方差不齐者用 Tamhane's T2 或 Dunnett's T3 法。

## 2 实验结果

2.1 各组胃黏膜肉眼观察结果 见图 1、图 2、图 3、图 4。空白组大鼠胃黏膜色泽红润,表面光滑,未见明显损伤;模型组大鼠胃腔内有积血,黏膜表面有大量血痂,胃体部可见多处点状、线状、甚至条带状的出血、糜烂;中药组大鼠胃黏膜色泽红润,有少量散在点状出血;西药组大鼠胃黏膜可见充血,表面有少量血痂,胃体部见数处溃疡形成。



图 1 空白组胃黏膜

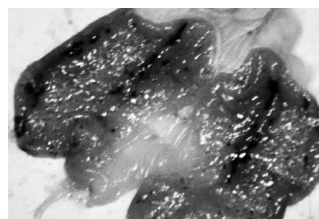


图 2 模型组胃黏膜

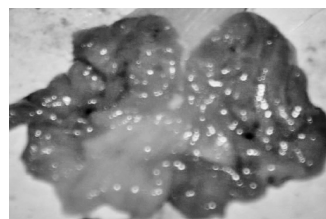


图 3 中药组胃黏膜

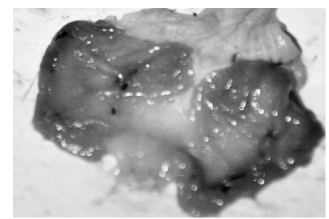


图 4 西药组胃黏膜

2.2 各组镜下观察结果 见图 5、图 6、图 7、图 8。空白组大鼠胃黏膜上皮结构完整,细胞排列整齐有序,胞核胞质清晰,黏膜下层和肌层层层清楚连续,未见炎性细胞浸润;模型组大鼠胃黏膜全层结构破坏,细胞排列无序,胃腺细胞大量坏死,胞核胞质模糊,细胞内可见充血水肿,毛细血管增生及出血,扩张的血管里可见大量的胞浆红染,黏膜下可见以淋巴细

胞为主的炎症细胞浸润的急性炎症反应,胃黏膜损伤明显;中药组胃黏膜表面有部分脱落,细胞内充血情况明显改善,炎症细胞浸润较少;西药组胃黏膜基本完整,黏膜上皮细胞较整齐,腺体排列规则,有少量炎性细胞浸润。

2.3 各组 UI 结果比较 见表 1。模型组大鼠 UI 最高,与空白组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示造模成功;与模

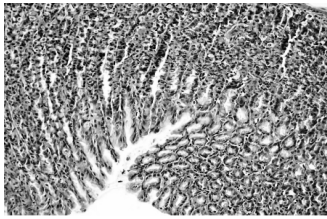


图5 空白组胃黏膜 (×100)

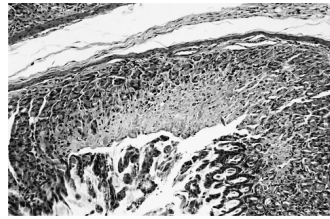


图6 模型组胃黏膜 (×100)

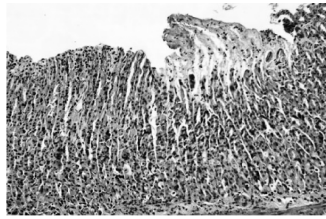


图7 中药组胃黏膜 (×100)

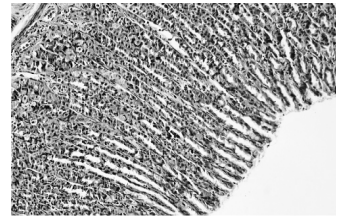


图8 西药组胃黏膜 (×100)

型组比较, 中药组和西药组 UI 均降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与中药组比较, 西药组的 UI 略有升高, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。中药和西药均可降低胃黏膜损伤指数, 疗效相当。

表1 各组 UI 结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 样本数 | UI                         |
|-----|-----|----------------------------|
| 空白组 | 10  | 0                          |
| 模型组 | 10  | 41.80 ± 5.59 <sup>①</sup>  |
| 中药组 | 10  | 22.70 ± 5.12 <sup>②③</sup> |
| 西药组 | 10  | 23.30 ± 7.90 <sup>②③</sup> |

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

2.4 各组 EGF、PGE<sub>2</sub> 含量比较 见表2。与空白组比较, 模型组 EGF 含量升高, PGE<sub>2</sub> 含量显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示模型组水浸束缚应激模型可减少胃黏膜 PGE<sub>2</sub> 的含量, 使溃疡周围 EGF 含量升高; 与模型组比较, 中药组和西药组可显著升高胃黏膜中 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 中药组胃黏膜中 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量低于西药组 ( $P < 0.05$ )。

表2 各组 EGF、PGE<sub>2</sub> 含量比较( $\bar{x} \pm s$ ) ng/L

| 组别  | 样本数 | EGF                           | PGE <sub>2</sub>            |
|-----|-----|-------------------------------|-----------------------------|
| 空白组 | 10  | 234.94 ± 10.02                | 22.88 ± 1.13                |
| 模型组 | 10  | 297.75 ± 8.88 <sup>①</sup>    | 17.28 ± 1.28 <sup>①</sup>   |
| 中药组 | 10  | 342.08 ± 9.93 <sup>②③</sup>   | 22.95 ± 1.27 <sup>②</sup>   |
| 西药组 | 10  | 400.32 ± 10.49 <sup>①②③</sup> | 27.27 ± 1.40 <sup>①②③</sup> |

与空白组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$ ; 与中药组比较, ③ $P < 0.05$

### 3 讨论

本实验采用水浸和束缚双重应激可使大鼠胃黏膜发生急性损伤, 其病理改变与人类应激性溃疡相似, 并且有高度的可重复性, 是目前常用的应激性溃疡研究模型。水浸束缚的不良刺激模拟中医“七情不遂”的病因, 以因定证, 制造了“证”(气机紊乱证)和病(应激性溃疡)相结合的动物模型<sup>[3]</sup>。胃是对应激反应最为敏感的器官之一, 身体和心理应激状态下很容易导致胃黏膜的急性损伤。

半夏泻心汤是斡旋脾胃气机的首选方, 被认为是治疗胃肠

疾病的首选方和基础方<sup>[4]</sup>, 并且较新临床和实验研究证实半夏泻心汤具有抗抑郁的作用<sup>[5]</sup>, 为中医学“辛开苦降法”防治心理应激性胃黏膜损伤“标本兼治”提供了理论支撑。

EGF 是一种具有广泛生物学效应的单链多肽, 它具有抑制胃酸分泌、促进上皮增殖、组织修复和细胞保护的多种作用, 在保护胃黏膜避免损伤因子的破坏, 降低胃黏膜损伤程度, 促进组织损伤修复过程, 维持胃黏膜的完整性方面起着非常重要的作用<sup>[6]</sup>。研究发现其可通过增加胃黏膜黏液黏蛋白的合成和分泌、诱导前列腺素的合成而使黏膜血流量增加<sup>[7]</sup>、促进鸟氨酸脱羧酶活性的增高等方式保护胃黏膜, 促进其修复。在 EGF 与应激性胃溃疡的关系中, 有研究发现应激性胃黏膜损伤过程的胃黏膜细胞凋亡, 与应激导致 EGF 含量下降, 胃黏膜失去内源性 EGF 的保护作用有关<sup>[8]</sup>。而 EGF 在应激性溃疡愈合过程中通过抑制上皮细胞的凋亡是其作用机制之一。同时凋亡增加也是胃黏膜上皮细胞增殖、自我修复的启动因素之一。

PGE<sub>2</sub> 是一种重要的细胞生长和调节因子, 人体内的内源性 PGE<sub>2</sub> 对消化系统有重要的作用, 具有增强防御因素和抑制攻击因素的作用, 具体可通过抑制胃酸分泌、促进胃液分泌和成分改变、增加局部血流量、稳定细胞膜的完整性等途径发挥对黏膜的保护作用<sup>[9]</sup>。也有研究证实, PGE<sub>2</sub> 还可通过抑制胃黏膜上皮细胞的凋亡保护胃黏膜<sup>[10]</sup>。

本实验中, 水浸束缚应激可导致胃黏膜损伤的同时, 损伤胃黏膜周边 EGF 含量有升高趋势, 可能是模型组胃黏膜损伤发生后机体的自我修复的反应, PGE<sub>2</sub> 含量明显下降。预先给予辛开苦降法的代表方半夏泻心汤, 能明显提高胃黏膜 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量, 降低胃黏膜的损伤程度。提示增加胃黏膜保护因子 EGF、PGE<sub>2</sub> 的含量, 从而增强对胃黏膜的保护作用, 提高胃黏膜的抗应激性损伤能力, 是辛开苦降法的半夏泻心汤防治黏膜应激损伤的作用机制之一。下一步值得探讨此法对水浸束缚应激引起的胃黏膜增殖和凋亡的影响。

### [参考文献]

[1] Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical as pfin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine [J]. Gastroenterology, 1979, 76(1): 88-93.

- [2] 柯雪帆, 赵章忠, 张玉萍, 等. 《伤寒论》和《金匮要略》中的药物剂量问题[J]. 中国中医药杂志, 1983(12): 36-38.
- [3] 李杰, 刘长江. 心理应激对大鼠下丘脑、胃黏膜 CRF 基因表达的影响及中药干预的实验研究[J]. 中医杂志, 2002, 43(9): 699-700.
- [4] 王泽凤, 王敏, 史新萍. 半夏泻心汤在胃肠疾病方面的应用[J]. 中国实用医药, 2009, 4(9): 167-168.
- [5] 李志强, 常红娟. 半夏泻心汤抗抑郁作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 280-282.
- [6] Yanaka A, Suzuki H, Shibahara, et al. EGF promotes gastric mucosal restitution by activating Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange of epithelial cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(5): 866-876.
- [7] 徐俊, 宋于刚, 武金宝, 等. 应激性溃疡大鼠血浆 EGF 水平和胃上皮细胞凋亡的变化[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2004, 24(2): 160-163, 175.
- [8] Celebi N, Turkyilmaz, Gonul B, et al. Effects of epidermal growth factor microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats[J]. J Control Release, 2002, 83(2): 197-210.
- [9] Akbulut KG, Gonul B, Turkyilmaz A, et al. The role of epidermal growth factor formulation on stress ulcer healing of the gastric mucosa[J]. Surg Today, 2002, 32(10): 880-883.
- [10] Kontuiek PC, Brzozowski T, Duda A, et al. Epidermal growth factor and prostaglandin E(2) accelerate mucosal recovery from stress-induced gastric lesions via inhibition of apoptosis [J]. J Physiol Paris, 2001, 95(1-6): 361-367.

(责任编辑: 骆欢欢)

## 夏枯草对 3 种肿瘤细胞抑制作用的实验研究

沈亚芬<sup>1</sup>, 丁勤霞<sup>1</sup>, 宋利斌<sup>1</sup>, 朱曙东<sup>1</sup>, 沈金根<sup>2</sup>

1. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310000; 2. 桐乡市第一人民医院, 浙江 桐乡 324500

**[摘要]** 目的: 探索夏枯草粗提物对 3 种肿瘤细胞(淋巴瘤细胞株 Jurkat、人肺癌细胞株 A-549、子宫内膜癌细胞株 Ishikawa) 生长抑制作用, 为夏枯草抗癌机制的深入研究提供实验参考依据。方法: 以不同浓度的夏枯草粗提物供试液作用于 3 种肿瘤细胞, 采用 MTT 法计算其 IC<sub>50</sub> 值, 观察药物对 3 种肿瘤细胞的抑制作用, 同时设置空白组、对照组、阳性对照组。结果: 夏枯草粗提物对 Jurkat 细胞、A-549 细胞、Ishikawa 细胞 IC<sub>50</sub> 值分别为 59.628 mg/mL、53.917 mg/mL、48.017 mg/mL, 且夏枯草对 3 种肿瘤细胞的抑制率在一定范围内随药物浓度增加而加强。结论: 夏枯草对 Jurkat 细胞、A-549 细胞、Ishikawa 细胞的增殖具有一定的抑制作用, 对抗癌机制的研究以及临床抗癌药物的筛选具有一定的参考价值。

**[关键词]** 夏枯草; 肿瘤; 细胞株; MTT 法; 体外增殖

**[中图分类号]** R73; R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2015)05-0273-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.05.129

夏枯草为唇形科多年生草本植物夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)的干燥成熟果穗<sup>[1]</sup>, 性寒, 味微苦、甘、辛, 主入肝经、胆经, 具有清火明目、散结消肿、清热活血、祛痰止咳的功效<sup>[2-4]</sup>。现代药理研究表明, 夏枯草具有降血糖、抗菌消炎、抗病毒感染、调节免疫、降血压、降血脂、保肝利胆等作用<sup>[5]</sup>。此外, 该药材对多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用<sup>[6]</sup>。笔者采用 MTT

法研究夏枯草粗提物对 3 种肿瘤细胞(淋巴瘤细胞株 Jurkat、肺癌细胞株 A-549、子宫内膜癌细胞株 Ishikawa) 体外增殖的影响, 为其抗癌机制的深入研究以及临床用药提供实验依据。

### 1 材料与方法

1.1 细胞株 淋巴瘤细胞株 Jurkat、肺癌细胞株 A-549 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库, 子宫内膜癌细胞株

**[收稿日期]** 2014-11-30

**[作者简介]** 沈亚芬(1974-), 女, 主管中药师, 研究方向: 中药材重金属含量测定。