

[参考文献]

- [1] 朱华, 高雅, 张可锋, 等. 不同产地火炭母中槲皮素的含量测定方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 557- 559.
- [2] 王金香. 火炭母药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 96- 98.
- [3] 周伟, 邵荣, 吴俊, 等. 蒲公英黄酮的超声辅助提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2696- 2698.
- [4] 韦玉, 高雅, 张可锋. 不同产地火炭母总黄酮含量测定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3265- 3266.
- [5] 吴怀恩, 甄汉深, 韦志英, 等. 侧柏叶不同炮制品中槲皮苷与槲皮素的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 354- 356.

(责任编辑: 马力)

胃舒汤对实验性胃溃疡大鼠的治疗作用及其对 NF- κ B 信号通路的影响

赖日明, 刘越滇, 聂旭检, 倪文颖

广州市增城区中医院, 广东 广州 510000

[摘要] 目的: 通过观察胃舒汤对实验性胃溃疡大鼠胃组织病理及胃组织白介素-2 (IL-2), 核转录因子 (NF- κ B) p65 蛋白表达水平的影响, 探讨其作用机制。方法: 48 只清洁级 Wistar 大鼠成功造模后, 根据完全随机数字表法随机分为正常组、模型组、奥美拉唑组、胃舒汤组。自造模后第 3 天, 正常组和模型组给予生理盐水, 奥美拉唑组、胃舒汤组分别给予奥美拉唑胶囊溶液、胃舒汤水煎液灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 13 天。观察用药过程中各组大鼠一般状态、胃大体形态学和组织病理学, 比较各组的胃组织病理指数, 测定并比较各组胃组织 IL-2、NF- κ Bp65 蛋白的表达水平。结果: 胃舒汤组和奥美拉唑组大鼠饮食、活动量、被毛等一般状态优于模型组, 且体重增长速度明显大于模型组, 尤以胃舒汤组更为明显。胃舒汤组和奥美拉唑组溃疡指数明显低于模型组 ($P < 0.01$), 且胃舒汤组溃疡指数明显低于奥美拉唑组 ($P < 0.01$)。模型组胃组织 IL-2 水平及 NF- κ Bp65 蛋白表达水平显著高于正常组 ($P < 0.01$), 奥美拉唑组及胃舒汤组 IL-2 水平及 NF- κ Bp65 水平均显著低于模型组, 且胃舒汤组的 IL-2 及 NF- κ Bp65 水平更低于奥美拉唑组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 胃舒汤对实验性胃溃疡大鼠具有较好的治疗作用, 其作用机制可能与通过抑制 NF- κ B 的活化及表达, 减少炎症因子的释放有关。

[关键词] 胃溃疡; 白细胞介素-2 (IL-2); 核转录因子- κ B (NF- κ B); 胃舒汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 06-0279-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.06.122

Therapeutic Effect of Weishu Tang on the Mice with Experimental Gastric Ulcer and Its Impact on NF- κ B Signal Path

LAI Riming, LIU Yuedian, NIE Xujian, NI Wenying

Abstract: Objective: To observe the curative effect of Weishu tang on stomach tissue pathology, and the expression levels of interleukin-2 (IL-2) and Nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) of mice with experimental gastric ulcer, and discuss its mechanism of action. Methods: After successfully molding, forty-eight clean Wistar mice were divided into normal group, model group, omeprazole group and Weishu tang group, according to the completely random number table. The third day after molding, mice in normal group and model group were given the normal saline, while mice in omeprazole group and Weishu tang group were respectively given omeprazole capsules solution and Weishu tang by gavage one time per day

[收稿日期] 2015-12-30

[作者简介] 赖日明 (1963-), 男, 副主任药师, 研究方向: 中药药理与药事管理研究。

continuously for 13 days. During the pharmacy process, observe the general status, the morphology and the histopathology of the mice in each group and compare the stomach tissue pathological index of each group and compare the expression level of IL-2 and NF- κ Bp65 of stomach tissue. Results: The general status such as eating and drinking, activity and further of mice in Weishu tang group and omeprazole group were better than that in model group, and the speed of weight growth was obviously higher than that in model group, especially for the mice in Weishu tang group. The Ulcer index in Weishu tang group and omeprazole group was obviously less than that in model group ($P < 0.01$), and the ulcer index of Weishu tang group was obviously less than that in omeprazole group ($P < 0.01$). The levels of stomach tissue IL-2 and the protein expression levels of NF- κ Bp65 of mice in model group were obviously higher than those in normal group ($P < 0.01$). The IL-2 levels and the protein expression levels of NF- κ Bp65 in omeprazole group and Weishu tang group were all obviously less than those in model group ($P < 0.01$). The levels of IL-2 and NF- κ Bp65 in Weishu tang group were even less than those in omeprazole group ($P < 0.01$). Conclusion: Weishu tang has preferable therapeutic effect on the mice with experimental gastric ulcer. Its mechanism of action may be related with restraining the excitation and expression of NF- κ B and reducing the release of inflammatory factor.

Keywords: Gastric ulcer; Interleukin-2(IL-2); Nuclear factor- κ B p65(NF- κ B p65); Weishu tang

胃溃疡(GU)是消化内科常见病之一,其发病缓慢,病程迁延,易反复发作,可见于任何年龄,尤以老年人为多见。研究认为,消化性溃疡是多种有害因素对胃黏膜的损害超过黏膜抵御外界损伤和自身修复能力所引起的结果^[1]。GU周围的黏膜往往存在慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生和异型增生的可能,若不及时治疗,1%的GU有可能转化为胃癌。本研究自拟胃舒汤干预实验性乙酸大鼠GU模型,旨在探讨胃舒汤干预慢性GU的机制,期望为临床治疗GU提供新的用药选择。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级Wistar大鼠48只,雌雄各半,体重200~220g,由南方医科大学实验动物中心提供。合格证号:SCXK粤2010-0015。

1.2 实验药物 胃舒汤药物组成:苍术12g,白术、茯苓、白芍、白及、蒲公英各10g,陈皮、制半夏各9g,田七3g、甘草6g。水煎煮2次,合并2次煎煮药液并浓缩,于用时配成适当浓度。奥美拉唑胶囊(海南海力制药有限公司生产,批号:120104)。

1.3 实验试剂 细胞总蛋白提取试剂盒由美国Pierce公司提供;兔抗小鼠核转录因子(NF- κ B)p65、 β -actin一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗均由美国Cell Signaling公司生产;增强化学发光法(ECL)发光液由北京碧云天生物技术有限公司提供;DAB显色试剂盒由北京中山金桥生物技术有限公司生产;大鼠白介素-2(IL-2)酶联免疫吸附试剂盒均由RD公司提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.4 动物分组及处理 所有大鼠适应性饲养3天,正常生长后用于实验。采用随机数字表法将48只大鼠随机分为正常组、模型组、胃舒汤组、奥美拉唑组,每组12只。除正常组外,其余3组大鼠均采用改良Okabe的方法^[2]造模。大鼠造模前均禁食不禁水24h,10%水合氯醛以0.32 mL/100 g剂量腹

腔内注射麻醉,大鼠麻醉完全后仰卧固定于解剖板上,常规腹壁备皮消毒铺洞巾,剑突下纵向做一长约2 cm切口剪开腹部,沿腹白线逐层打开腹腔,局部腹腔拉钩暴露术野,通过无齿镊逐步游离,最终沿肝脏后找出胃体,沿胃窦前壁近小弯侧注入0.05 mL的100%乙酸,深度应至达胃壁肌层与浆膜层之间。0号丝线缝合线依次缝合腹膜、腹壁各层组织及皮肤。造模结束后将大鼠放回鼠笼饲养。正常组和模型组均自造模后第3天开始给予生理盐水1 mL/100 g灌胃,每天1次。奥美拉唑组自造模后第3天后开始给予0.72 mL/100 g的奥美拉唑胶囊溶液(浓度为1 mg/mL)灌胃,每天1次。胃舒汤组自造模后第3天开始给予1 mL/100 g的胃舒汤水煎液(1 g生药/kg),每天1次,各组均连续灌胃给药13天。取病理组织的前1天中午起,大鼠禁食不禁水。每组随机处死2只大鼠,开腹、取胃组织后,用4%福尔马林固定行病理组织学检查。参照2009年版的《实用内科学》中胃溃疡的病理诊断标准,3组大鼠胃溃疡模型均造模成功。

1.5 一般状态观察 每天观察并记录实验性大鼠的食量、饮水量、体重、活动情况及被毛光泽度等一般状态。

1.6 胃大体形态学和组织病理学观察 给予药物干预13天后,各组大鼠均禁食24 h,运用10%水合氯醛(0.32 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠后,剖腹取出全胃。胃大弯处剖开并用冰生理盐水冲洗数次后,滤纸吸干,观察胃组织大体形态。参照文献[3]标准,测量溃疡最大直径及与直径垂直的最宽距离,二者相乘即为溃疡面积,深度则分为 ≥ 2 mm或 < 2 mm计算。根据溃疡指数表计算溃疡体积。比较各组溃疡指数。于各组大鼠胃小弯处剪取大小为0.5 cm \times 0.5 cm的组织条,4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,常规HE染色,置于光镜下观察胃黏膜损伤情况。

1.7 细胞因子IL-2和蛋白NF- κ Bp65的检测 细胞因子IL-2

严格按照 ELISA 试剂盒说明书,采用 ELISA 法检测胃黏膜组织 IL-2 水平。蛋白免疫印记法测定 NF-κBp65 的含量,取液氮速冻大鼠胃组织,迅速研磨成细粉并提取组织总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白含量。12% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜、封闭,加入 NF-κBp65 抗体, ECL 显色,显影,定影,利用图像处理软件计算目的蛋白表达量。

1.8 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件包进行数据分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Dennett T3 法。

2 结果

2.1 各组大鼠的一般状态 正常组大鼠活动自如,饮水、进食量稳定,体重增加,毛色光泽,尾色红润,大小便正常。模型组大鼠造模后 1 天即出现活动量减少,食欲下降,精神萎靡,体重明显减轻,反应迟钝,毛杂乱无光泽蓬松,喜静扎堆,拱背,尾色苍白无光,大便常稀溏无规律。术后第 5 天上述症状最为显著。随时间推移约 10 天后,上述症状逐渐缓解,饮食和活动量恢复,被毛较前有光泽。胃舒汤组和奥美拉唑组用药干预后,大鼠食欲下降、活动减少、体重减轻等现象迅速恢复,用药后约 3 天上述症状基本缓解,但仍有部分大鼠大便稀溏不成形。用药期间体重增长速度明显高于模型组,尤以胃舒汤组最为明显。

2.2 各组大鼠胃大体形态观察及胃溃疡指数比较 见表 1。正常组大鼠胃黏膜正常,无损伤,呈粉红色,表面光滑覆盖大量黏液,皱襞平滑有光泽无断续,胃壁弹性良好,未见溃疡、充血及水肿。模型组大鼠胃内可见大量内容物残留,胃窦前壁黏膜面可见直径约 0.5~1.2 cm 圆形溃疡,底部平坦并可见轻

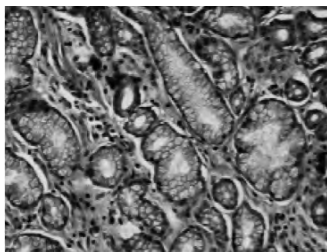
度充血水肿,胃皱襞不连续,新生皱黏膜稍粗大,愈合的溃疡部位胃壁明显增厚。胃舒汤组和奥美拉唑组用药干预后大鼠胃腔内容物残留较模型组少,溃疡的面积、深度均小于模型组。胃舒汤组和奥美拉唑组溃疡指数明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而胃舒汤组溃疡指数亦明显低于奥美拉唑组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠胃溃疡指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	溃疡指数(mm ²)
正常组	12	0
模型组	12	16.32± 1.73
奥美拉唑组	12	9.15± 0.62 ^①
胃舒汤组	12	6.37± 0.41 ^②

与模型组比较,① $P < 0.01$;与奥美拉唑组比较,② $P < 0.01$ 。

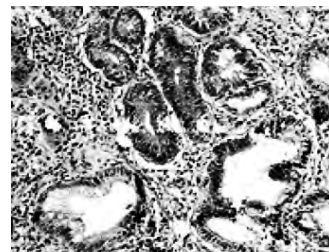
2.3 各组大鼠胃组织病理学观察 见图 1。光镜下观察显示,正常组大鼠胃黏膜正常,无充血、水肿和糜烂,胃黏膜上皮细胞和腺体排列整齐规则,分界清楚,未见明显炎性细胞浸润。模型组胃窦小弯侧黏膜可见溃疡形成,有的溃疡可深至肌层或达浆膜层,胃黏膜固有腺体结构被破坏,局部充血、水肿明显,溃疡底部可见大量炎性细胞、坏死组织、肉芽组织形成。胃舒汤组和奥美拉唑组可见胃黏膜轻度破坏,局部溃疡周围可见上皮细胞移行,并可见肉芽组织覆盖了大部分溃疡底部,部分腺体已重建,仅黏膜层见少量炎性细胞浸润,坏死组织消失,胃黏膜各层结构清楚。胃舒汤组胃黏膜炎症改善情况明显好于奥美拉唑组。



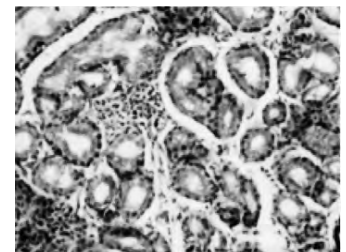
正常组



模型组



奥美拉唑组



胃舒汤组

图 1 各组大鼠胃组织病理学观察 (40x)

2.4 各组大鼠胃组织 IL-2 和 NF-κBp65 表达比较 见表 2。模型组胃组织 IL-2 水平明显高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.01$);干预后,各给药组大鼠 IL-2 水平显著低于模型组($P < 0.01$),奥美拉唑组和胃舒汤组间比较,以胃舒汤组降低更明显($P < 0.01$)。模型组大鼠胃组织 NF-κBp65 蛋白表达水平显著高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。干预后,奥美拉唑组和胃舒汤组 NF-κBp65 水平显著降低,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),胃舒汤组降低最明显($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠胃组织 IL-2、NF-κBp65 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-2(ng/L)	NF-κBp65
正常组	12	21.06± 7.23	9.13± 1.02
模型组	12	263.52± 27.61 ^①	56.17± 5.69 ^①
奥美拉唑组	12	132.76± 23.51 ^②	39.21± 5.13 ^②
胃舒汤组	12	102.17± 21.26 ^{②③}	21.65± 3.27 ^{②③}

与正常组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.01$;与奥美拉唑组比较,③ $P < 0.01$

3 讨论

GU 是消化系统的常见病之一, 临床多表现为持续性上腹部灼痛, 亦可表现为钝痛、胀痛、剧痛或饥饿样不适感等, 多具有节律性, 伴有腹胀、恶心、泛酸等, 严重者可出现黑便与呕血, GU 可发生于任何年龄, 老年人为主要的发病人群, 临床多发病缓慢、病程迁延, 复发率较高, 若不及时治疗, 迁延难愈, 最终可转化为胃癌。对于发病机制, 近年来炎症损伤在其发病的作用逐渐受到重视。多种炎症细胞因子的过度表达导致胃黏膜的炎症损伤^[4-5]。NF- κ B 是一个多功能核转录因子, 在多种炎症反应通路中起重要作用^[6-7]。在病理条件下, NF- κ B 受氧自由基、内毒素、细胞因子的刺激而磷酸化被激活, NF- κ B 迅速由胞浆移位至核内, 调控相应的靶基因, 如前炎症介质黏附分子、趋化因子的持续过度表达, 且炎症介质可再次激活 NF- κ B, 导致炎症反应的循环级联放大, 最终造成胃黏膜的损伤。

目前, 针对 GU 的治疗, 西医多以抑制胃酸分泌、抗幽门螺杆菌感染和保护胃黏膜为主, 虽取得一定疗效, 但停药后易复发, 且有一定的不良反应, 部分患者难以耐受。部分学者运用中医药方法治疗 GU 取得较好疗效, 因此, 中医药理论诊治 GU 的研究成为热点^[8-9]。

GU 辨病属中医“胃痛”“痞证”范畴。胃为中土, 主受纳腐熟水谷, 以降为顺, 以通为用, 湿热、气滞、血瘀、寒凝、痰浊等病理因素损伤脾胃, 致脾胃虚弱, 脾不化湿, 胃气失和, 升降失调。因此 GU 以脾胃虚弱、升降失调为其主要病机, 治疗上以化湿、行滞、和胃为法。胃舒汤由苍术、白术、陈皮、制半夏、茯苓、白芍、白及、田七、蒲公英、甘草组成。本方由平胃散和二陈汤加减而成, 方中苍术燥湿健脾, 祛风散寒, 为君药; 陈皮理气健脾, 燥湿化痰, 制半夏能行水湿, 降逆气, 而善祛脾胃湿痰, 茯苓渗湿利水, 健脾和胃, 白芍养血和营, 缓急止痛, 敛阴平肝, 与甘草合用取芍药甘草汤之意以平肝敛阴, 缓急止痛, 四药合用共助君药理气健脾, 燥湿化痰, 且兼止痛之效, 共为臣药; 白及收敛止血, 消肿生肌, 善治一切疮疖痛疽, 田七化瘀止血, 活血定痛, 用于各种内、外出血, 胸腹刺痛等, 具有止血而不留瘀, 化瘀而不伤正的特点, 蒲公英清热解毒, 消痈散结, 善治肺痈、肠痈、胃火、肠炎等, 三药合用则活血行气、散瘀止痛、止血生肌; 甘草调和诸药。方中诸药合用共奏燥湿健脾、理气止痛、敛疮生肌之效。

本研究结果显示, 胃舒汤组和奥美拉唑组干预后大鼠的食欲下降、活动减少、体重减轻等现象迅速恢复, 一般状态良好, 体重增长速度明显高于模型组, 且胃舒汤组显著高于奥美拉唑组。进一步病理观察显示, 胃舒汤组的溃疡面积、深度均

显著缩小, 且溃疡指数显著降低, 且更低于奥美拉唑组, 提示胃舒汤能显著改善胃溃疡大鼠的组织病理, 减轻胃黏膜的病理损伤, 从而进一步改善大鼠的一般状态。模型组胃组织 IL-2 水平及 NF- κ Bp65 蛋白表达水平显著高于正常组, NF- κ B 的过度激活及其介导的炎症反应参与了 GU 的发病。胃舒汤组 IL-2 水平及 NF- κ Bp65 水平均显著低于模型组和奥美拉唑组, 反映出胃舒汤对 GU 的治疗作用可能通过抑制 NF- κ B 的过度激活及炎症反应起作用, 且疗效优于奥美拉唑。

综上, 胃舒汤对实验性 GU 大鼠模型具有较好的治疗作用, 其作用机制可能是通过抑制 NF- κ B 的活化及表达, 减少炎症因子的释放, 减轻胃黏膜的炎症反应及病理损伤, 从而起到治疗作用。

[参考文献]

- [1] 杨薇. 消化性溃疡发病相关因素探讨[J]. 现代消化及介入诊疗, 2014, 19(6): 399-400.
- [2] 北京医学院. 几种药物对大白鼠慢性实验性胃溃疡愈合的影响[J]. 北京医学院学报, 1975(3): 169-173.
- [3] 刘娜, 江伟, 唐静, 等. 溃疡方对乙酸胃溃疡大鼠 TFF1、EGF 和 EGFR 的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 24(1): 51-54.
- [4] 金少琴, 毛华, 黄纯焯, 等. 幽门螺杆菌阳性溃疡与细胞因子基因多态性的关系[J]. 国际消化病杂志, 2012, 32(3): 159-161.
- [5] 刘改芳, 姚希贤, 冯丽英, 等. Hp 感染性胃病与 TH1/TH2 细胞因子行为的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(10): 1105-1108.
- [6] 张超贤, 郭李柯, 郭晓凤, 等. 三硝基苯磺酸/乙醇灌肠液诱导大鼠溃疡性结肠炎 TLR4/NF- κ B 和 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路的表达及电针的干预作用[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2015, 36(2): 263-270.
- [7] 吴继雄, 邓亚芳, 方亮, 等. 慢性萎缩性胃炎患者体内 NF- κ B 和 Bcl-2 的表达及意义[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(7): 895-900.
- [8] 白析玮, 曲怡, 蒋宁, 等. 消痈溃得康对乙酸致胃溃疡模型大鼠血清 GAS 及 MTL 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 188-190.
- [9] 林科名, 丁世兰, 王强松, 等. 左金丸总生物碱对束缚水浸应激性胃溃疡模型大鼠神经体液调节的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 401-405.

(责任编辑: 骆欢欢)