

健脾益气方对急性胃粘膜损伤大鼠 热休克蛋白的影响*

李国成¹ 罗树星¹ 黄 燊¹ 陈训武² 邱绮玉¹

内容提要 目的:探讨健脾益气方(JPYQR)抑制胃粘膜损伤的作用机理。方法:采用束缚水浸法造成大鼠急性胃粘膜损伤,测定溃疡指数,检测血浆及胃组织中热休克蛋白(heat shock protein, HSP₇₀)的变化,并对胃组织细胞 HSPs 进行免疫组织化学研究。结果:用中药 JPYQR 和西药丽珠得乐预处理的大鼠,溃疡指数小于模型组($P < 0.001$),而 JPYQR 组又小于丽珠得乐组($P < 0.01$);预处理两组血浆及胃组织中 HSP₇₀ 水平相反明显高于模型组($P < 0.05$),而 JPYQR 组血浆中 HSP₇₀ 水平又显著高于丽珠得乐组($P < 0.05$),二者胃组织中的 HSP₇₀ 水平虽有差异,但无统计学意义($P > 0.05$);免疫组织化学研究提示腺体表达大量 HSP₇₀ 和 HSP₆₀,按模型组、丽珠得乐组、JPYQR 组依次增强。结论:中药健脾益气方能诱导大鼠提高 HSPs 的表达,防止胃粘膜损伤,HSPs 可能介导胃粘膜防御。

关键词 健脾益气方 热休克蛋白 急性胃粘膜损伤

Effect of Jianpi Yiqi Recipe on the Heat Shock Proteins in Rats with Acute Injury of Gastric Mucosa Li Guocheng, Luo Shuxing, Huang Yu, et al Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan (430030)

Objective: To investigate the mechanism of Jianpi Yiqi Recipe (JPYQR) in inhibition of gastric mucosa injury. **Methods:** A rat model of acute injury of gastric mucosa was established by binding and immersing in water. Ulcer index (UI) was measured, change of heat shock protein (HSP₇₀) in plasma and gastric tissue was examined, and the gastric HSPs was studied immunohistochemically. **Results:** The UI in rats pretreated with JPYQR or Lizhudele was lower than that of model group ($P < 0.001$), and UI of JPYQR group was lower than that of Lizhudele group ($P < 0.01$). On the other hand, the HSP₇₀ level in the two pretreated groups were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$), and the plasma HSP₇₀ level of JPYQR group was higher than that of Lizhudele group ($P < 0.05$). The difference of gastric HSP₇₀ level between the two pretreated groups was insignificant ($P > 0.05$). Immunohistochemical study revealed a high level expression of HSP₇₀ and HSP₆₀ by glands and the level of the expression in model group was the highest, followed by those in Lizhudele group and JPYQR group. **Conclusion:** JPYQR could enhance the expression of HSPs in rats, and so as to prevent the gastric mucosa from injury. HSPs might involve in the defending mechanism of gastric mucosa.

Key words Jianpi Yiqi Recipe, heat shock protein, acute injury of gastric mucosa

生物体在高温或其他因素应激下会诱导基因开放而合成一组新的蛋白质,即热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)⁽¹⁾,HSPs 在维持细胞的正常形态及功能中起着重要作用。本研究选用大鼠束缚水浸造成急性胃粘膜损伤模型,观察健脾益气方(JPYQR)对大鼠血浆及胃组织中 HSPs 的影响,探讨 HSPs 与胃粘膜防御的关系,为 JPYQR 的临床疗效提供理论依据。

材料与方法

1 动物及分组 清洁级健康 Wistar 大鼠 40 只,雌雄不限,体重 150~200g,由同济医科大学实验动物学部提供。大鼠随机分为对照组、模型组、JPYQR 组和丽珠得乐组,每组 10 只。

2 药物与试剂 自制 JPYQR 药膏(由党参、白术、黄芪、木香、砂仁、蒲黄、玄胡等药组成,每克药膏含生药 4.5g),丽珠得乐冲剂(每包 1g,含铋 0.11g,珠海经济特区丽珠制药厂,生产批号:9603044)。兔抗人

* 国家中医药管理局资助课题(No.95B151)

1. 同济医科大学附属同济医院(武汉 430030);2. 大冶钢厂职工医院

HSP₇₀、HSP₆₀抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗兔 IgG(加拿大生产,由同济医科大学职业病研究所提供);DAB 显色液、SABC 即用型试剂盒(由武汉市博士德生物工程公司进口分装提供);其余化学试剂购于市售,级别为分析纯。

3 主要仪器 LS-20 III 高速冷冻离心机(日本 TOMY SEIKO 公司),722 型分光光度计(上海第三分析仪器厂),CS-930 双波段色谱扫描仪(日本岛津公司),36 孔点样器等。

4 动物造模及实验方法 大鼠禁食不禁水 24h 后,JPYQR 组按 0.3g/100g 体重,丽珠得乐组按 0.03g/100g 体重,均稀释成 1ml/100g 体重灌胃,对照组和模型组代以生理盐水灌胃。除对照组外各组动物灌胃 1h 后采用束缚水浸方法⁽²⁾造模。动物束缚水浸 6h 后,连同对照组动物在戊巴比妥钠(4mg/100g 体重灌胃)麻醉下剖腹,腹主动脉采血,2% EDTANa₂ 抗凝(9:1),分离血浆,4℃ 保存备用;沿胃大弯剪开胃测量溃疡指数,同时留取腺胃部组织并匀浆备用,另取胃组织 2mm×2mm,于 10% 中性福尔马林中 4℃ 固定 48h,石蜡包埋备用。

5 观察项目及方法

5.1 溃疡指数测定 按文献⁽³⁾方法。用精确度为 0.02mm 的游标卡尺测量粘膜损伤之长径,将所有长径之值相加即为溃疡指数。

5.2 血浆及胃组织中 HSPs 的检测 (1)按何晓生的 Western 斑点印迹法⁽⁴⁾检测。(2)免疫组织化学法:按 SABC 即用型试剂盒说明书步骤具体操作,在显微镜下观察胃组织细胞 HSP₇₀、HSP₆₀ 的表达分布情况。

6 统计学处理 用 *t* 检验对各组均数进行比较。

结 果

1 各组动物溃疡指数比较 如表 1 所示,模型组溃疡指数明显大于其他组($P < 0.001$),JPYQR 组最小,与丽珠得乐组比较, $P < 0.01$ 。

2 各组动物血浆及胃组织中 HSP₇₀ 水平比较 由表 2 可见,模型组动物经过束缚水浸后,血浆及胃组织中 HSP₇₀ 水平都有一定程度升高(与对照组比较, $P < 0.05$),而预先给予 JPYQR、丽珠得乐的动物血浆及胃组织中 HSP₇₀ 水平升高更明显(与对照组比较, $P < 0.01$,与模型组比较, $P < 0.05$)。JPYQR 组血浆 HSP₇₀ 水平也显著高于丽珠得乐组($P < 0.05$)。

3 免疫组织化学研究 在正常大鼠胃组织中,可见 HSP₇₀ 及 HSP₆₀ 表达,二者均以粘膜上皮表达较为明

表 1 各组动物溃疡指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	样品数	溃疡指数
模 型	10	69.74 ± 14.06
JPYQR	10	15.60 ± 4.74 * △
丽珠得乐	10	25.21 ± 5.88 *

注:与模型组比较,* $P < 0.001$;与丽珠得乐组比较,△ $P < 0.01$

表 2 各组动物血浆及胃组织 HSP₇₀ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	样品数	HSP ₇₀	
		血浆	胃组织
对 照	8	5440.29 ± 2105.93	2974.13 ± 817.57
模 型	7	8086.92 ± 2103.80 *	4234.82 ± 1289.06 *
JPYQR	8	12240.99 ± 4194.66 * * △	7159.06 ± 2716.80 * * △
丽珠得乐	7	10729.77 ± 2843.49 * * △	6673.86 ± 1995.60 * * △

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$;与丽珠得乐组比较,▲ $P < 0.05$

显,HSP₇₀ 位于胞浆及细胞膜周围,而 HSP₆₀ 主要位于胞浆。当动物应激后,腺体则表达大量 HSP₇₀ 和 HSP₆₀,以 HSP₇₀ 较明显,并且可见核中表达,从其程度上看,按模型组、丽珠得乐组、JPYQR 组依次增强。

讨 论

热休克蛋白参与介导蛋白质的转位、折叠、装配等过程,但它们不成为新合成蛋白质的组成部分,这种功能被称为“分子伴侣”⁽⁵⁻⁷⁾。许多研究证实了整体动物的热处理可预防随后心、脑、肺、视网膜等的损伤,并认为全身热处理对这些器官的保护作用与 HSPs 的表达有关⁽⁸⁾。我们对大鼠用中药 JPYQR 和西药丽珠得乐进行了预处理,随后用束缚水浸法复制急性胃粘膜损伤模型,结果显示:不仅预处理组溃疡指数显著小于模型组($P < 0.001$),而且预处理组血浆及胃组织中 HSP₇₀ 水平相反 明显高于模型组($P < 0.05$),二者呈明显负相关。免疫组织化学研究也显示预处理组胃组织细胞 HSP₇₀ 及 HSP₆₀ 表达的水平较模型组明显增强,进一步提示 HSPs 可能是胃粘膜防御系统的重要组成部分,其机理可能系 HSPs 的“分子伴侣”作用,也就是预处理表达的 HSPs 与应激状态下产生的变性蛋白的结合而减少了胃粘膜的损伤。

JPYQR 具有健脾益气、理气止痛、活血化瘀之功效,临床治疗消化性溃疡有满意疗效。消化性溃疡属中医“胃脘痛”范畴,由于脾胃相表里,同为后天之本,故胃病常涉及于脾。因此治疗首选党参、黄芪健脾益气以固本,辅以木香、砂仁理气止痛,蒲黄、玄胡活血祛瘀以治其标,共奏扶正祛邪之功,则疾病自愈。现代医学认为消化性溃疡的发生系胃粘膜保护因子与攻击因子失衡所致,其中保护因子的削弱更为重要,故近年来

对消化性溃疡的研究注重胃粘膜保护。本实验结果与刘宝臣报道^[9]相似,提示 JPYQR 可能具有增强机体免疫力,改善抗病能力的作用,从而扩张了胃粘膜血管,增加了血流量,增加了胃粘液分泌,提高了胃粘膜防御能力。

在消化性溃疡的发生与治疗中,中药与 HSPs 的关系少见报道,本实验的结果提示,预先给大鼠 JPYQR 可明显减轻胃粘膜的损伤程度,其溃疡指数显著小于丽珠得乐组($P < 0.01$)。同时血浆及胃组织中诱导的 HSPs 水平明显提高,特别是血浆中 HSP₇₀ 水平显著高于丽珠得乐组($P < 0.05$)。Hirakawa 等的研究发现,束缚水浸对大鼠胃粘膜 HSPs 的诱导发生在粘膜损伤之前,而且预先经胃内给予一种抗溃疡药二香叶基丙酮(GGA)可诱导 HSPs 更高水平的表达并防止胃粘膜发生严重损伤,他们认为 HSPs 具有细胞保护作用并介导 GGA 的粘膜防御机制^[10]。由此提示 JPYQR 具有明显的粘膜保护作用,其作用机理可能与促进机体的 HSPs 表达密切相关。胃粘膜防御有诸多因素,虽然 JPYQR 对胃粘膜的保护作用优于丽珠得乐,但其对胃组织中的 HSPs 水平影响与丽珠得乐组比较并无显著性差异($P > 0.05$),由此亦说明 JPYQR 对胃粘膜的保护作用是多因素协同作用的结果,至于 JPYQR 还通过其他什么机制参与胃粘膜防御,尚需进一步研究。

参 考 文 献

1. Subjeck JR, Thugn T. Stress proteins cycterns of mammalian cells. *Am J Physiol* 1996;250:c1—c17.
2. Robert A, Anzamis JE, Lancaster C, et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 1979;77:433—443.
3. Sakamoto T, Swierczek JS, Ogden D, et al. Cytoprotective effect of pentagastrin and epidermal growth factor on stress ulcer formation. *Ann Surg* 1985;201:290—295.
4. 何晓生,潘秋萍,邬堂春,等. Western 斑点印迹法检测主要热应激蛋白. *中华劳动卫生与职业病杂志* 1996;14(6):376—377.
5. Hemmingsen SM, Woolford C, Saskia M, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 1988;333:330—334.
6. Craig EA. Chaperones: Helpers along the pathways to protein folding. *Science* 1993;260:1902—1903.
7. Agard DA. To fold or not to fold. *Science* 1993;260:1903—1904.
8. Menowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 1995;95:3—12.
9. 刘宝臣,沈 鹰. 胃粘膜保护方对大鼠胃粘液和胃粘膜血流的作用. *中华消化杂志* 1990;10(6):359—360.
10. Hirakawa T, Rokutan K, Nikawa T, et al. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996;111:345—357.

(收稿:1997-07-21 修回:1997-11-16)

全国难治病临床研讨会征文通知

为了发挥中医药在难治病、奇特症、慢性病方面的优势和专长、促进中医药治疗难治病的学术交流和发 展,使难治病的治疗方法起到进一步普及和推广应用,中国中医药学会决定于 1998 年 9 月在西安召开中医难治病临床研讨会,现征文如下:

征文内容:(1)世界卫生组织规定的 128 种难治病:包括病毒感染性疾病、心脑血管疾病、癌症、血液系统疾病、内分泌疾病、自身免疫及结缔组织疾病等,以及稀有、奇特病证的临床总结和辨证论治;(2)中医药治疗难治病的古方、验方、单方、秘方、土方、经方总结与发掘;(3)难治病的各种疗法介绍;(4)难治病、奇特症个案介绍;(5)难治病文献整理、综述、评述;(6)难治病的分类与实验研究:①中医药治疗病毒性肝炎及对抗肝纤维化的研究;②中医药治疗艾滋病、性疾病的研究;③中医药治疗癌症及减毒增效的研究;④中医药治疗血液病的研究;⑤中医药治疗风湿、类风湿、痛风、红斑狼疮等疾病的研究;⑥中医药治疗心脑血管疾病、肥胖症、高脂血症的研究;⑦中医药治疗糖尿病、甲状腺疾病的研究;⑧中医药治疗胆石症、抗溃疡复发的研究;⑨中医药治疗慢性肾病及肾衰的研究;⑩中医药治疗骨质疏松、非感染性股骨头坏死的研究;⑪中医药治疗牛皮癣、硬皮病及皮肤病的研究;⑫中医药戒毒的研究;⑬中医药治疗癫痫的研究。

征文要求:(1)内容具有科学性、实用性、先进性(论文集将公开出版);(2)文字打印或用 400 字稿纸誊写,字体清楚;(3)全文以不超过 4000 字为宜,附 400 以内的中文摘要,加盖单位公章;(4)论文题目之下按顺序注明邮编、姓名、工作单位、联系电话;(5)截稿日期:1988 年 6 月 15 日(以邮戳为准)。

征文请寄:北京市宣武区北线阁 5 号中国中医研究院广安门医院刘喜明收。同时寄审稿费 20 元(勿夹在信封内)。邮编:100053,电话:63013311—905。