

健脾化瘀中药对大鼠胃溃疡愈合质量的影响

刘建平 胡冬菊 宗全和[△] 陈志强[△] 牛兵占[△]

摘要 目的 观察健脾化瘀中药对大鼠消化性溃疡愈合质量的影响,进而阐明其抗胃溃疡的可能机制。方法 采用乙酸注射至大鼠胃浆膜下形成胃溃疡模型,随机分为 4 组,即空白组(灌服生理盐水)、模型组(灌服生理盐水)、雷尼替丁组(灌服雷尼替丁)、中药组(灌服健脾化瘀中药)。用 HE 染色法对大鼠愈合性胃溃疡再生黏膜进行定量观察,用放射免疫的方法检测血清及胃黏膜的表皮生长因子(EGF)的含量,用免疫组织化学法检测胃黏膜表皮生长因子受体(EGFR)蛋白表达。结果 中药组再生黏膜厚度高于模型组及雷尼替丁组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),中药组及雷尼替丁组胃黏膜组织的 EGF 的含量显著高于模型组($P < 0.01$),中药组胃黏膜 EGFR 蛋白表达较模型组增加($P < 0.05$)。结论 健脾化瘀中药可能是通过 EGFR 介导来促进胃黏膜上皮细胞增生,抑制胃酸,改善胃黏膜微循环,从而提高胃溃疡愈合质量,发挥抗溃疡作用。

关键词 健脾化瘀中药;胃溃疡;溃疡愈合质量;表皮生长因子;受体;免疫组织化学方法

Effect of Chinese Drugs for Jianpi Huayu on Healing Quality of Gastric Ulcer in Rats LIU Jian-ping, HU Dong-ju, ZONG Quan-he, et al *Hebei Medical University, Shijiazhuang (050011)*

Objective To observe the effect of Chinese drugs of Jianpi Huayu(JPHY, strengthening Pi and dissolving stasis) on healing quality of gastric ulcer and its mechanism. **Methods** The gastric ulcer model was established by subserous injection of ethanoic acid in rats. Rats were randomly divided into 4 groups, the blank group, the model group, the ranitidine(RT) group and the JPHY group. Quantity of regenerative mucosa of healed gastric ulcer was determined using HE stain, epidermal growth factor(EGF) content in serum and stomach mucosa was detected by RIA and epidermal growth factor receptor(EGFR) protein expression was determined by immunohistochemistry. **Results** Thickness of regenerated mucosa in the CHM group was higher than that in the model group and the RT group($P < 0.05$ or $P < 0.01$); EGF content in mucosa in the JPHY group and the RT group was higher than that in the model group($P < 0.01$) and EGFR protein expression in the JPHY group was higher than that in the model group($P < 0.05$). **Conclusion** JPHY could improve the proliferation of epithelial cells, inhibit gastric acid, improve microcirculation of gastric mucosa through the mediation of EGFR, so as to elevate the healing quality of gastric ulcer, display its anti-ulcer action.

Key words Chinese drugs for Jianpi Huayu; gastric ulcer; quality of ulcer healing; epidermal growth factor; receptor; immunohistochemistry

消化性溃疡(peptic ulcer, PU)是临床上常见病、多发病,药物治疗近期愈合较好,但停药后溃疡年复发率达 60%~80%,因此防治消化性溃疡的复发依然是治疗消化性溃疡的一大难题。我们在临床上用健脾化瘀中药组成的方剂(简称中药)治疗消化性溃疡取得了愈合率高、复发率低的效果,但其机理尚不清楚。近年

来研究资料显示,完全治愈的溃疡其复发率很低^[1],因此,溃疡愈合质量(quality of ulcer healing, QOUH)逐渐引起人们的重视。随着生长因子研究的进展,其对消化道的修复作用日益受到人们的重视。为此我们设计了本课题,试图探讨健脾化瘀中药对表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的影响,以及与消化性溃疡愈合质量关系,为临床治疗提供理论根据。

基金项目 河北省教育厅资助课题(No. 2003120)

作者单位 河北医科大学(石家庄 050011)

通讯作者:刘建平,现在河北省中医院消化内科(石家庄 050011)

Tel 0311-5990158, E-mail liujianping0311@yahoo.com.cn

[△]导师 万方数据

材料和方法

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 雄性大鼠,体重 220~

250g, 共 32 只, 由河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物 健脾化瘀中药由党参 30g 沙参 30g 当归 9g 川芎 9g 白芍 20g 茯苓 12g 白术 9g 柴胡 12g 黄芩 9g 黄连 6g 枳实 12g 丹参 20g 蒲公英 20g 元胡 12g 三七粉 3g (冲服) 炙甘草 9g 组成, 中药饮片购自河北省中医院, 按汤剂的要求水煎后浓缩, 每毫升含中药 2.7g; 雷尼替丁每粒 150mg, 汇仁制药有限公司出品。EGF 试剂盒由南京建成生物工程有限公司提供, EGFR 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 分组及模型制备 动物随机分为 4 组, 即空白组、模型组、雷尼替丁组、中药组, 每组 8 只。除空白组外其余 3 组按有关文献^[2]的方法造模, 造模后第 3 天开始治疗, 中药组按 2.0g/100g 体重每日灌胃健脾化瘀中药 1 次, 雷尼替丁组按 2.7mg/100g 体重每日灌胃雷尼替丁 1 次, 空白组、模型组灌胃等容积的生理盐水, 每组均连续灌胃 14 天。

2.2 标本采集及处理 灌胃 14 天后停药, 各组大鼠禁食 24h, 断头处死取血, 静置 2~3h 后分离血清, 置 EP 管中, -20℃ 冰箱保存待测; 剪开大鼠腹腔, 分别结扎贲门、幽门端后取出胃, 沿胃大弯剪开, 冰生理盐水冲洗, 以溃疡瘢痕平行于胃长轴方向的最长径为中心取材, 迅速置于 10% 中性甲醛中固定 24h, 按照常规脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 5μm 厚度, 以瘢痕的最长径为中心连续切片。另留取距溃疡边缘 3mm 以内的组织 100mg 以备检测 EGF。

2.3 检测指标及方法 再生黏膜厚度及黏膜肌缺损宽度测定: 在 HE 染色的切片上, 在高倍镜下观察测量, EGF 含量测定采用放射免疫法, 按试剂盒说明书步骤操作, EGFR 蛋白表达采用免疫组织化学方法, 按试剂盒说明书操作, 每次实验以 PBS 代替一抗做阴性对照, 用已知的阳性片 (乳腺癌组织切片) 做阳性对照。图像分析: 每组随机抽取 6 只大鼠的切片各 1 张, 每张随机选取 5 个视野, 采用北航彩色病理图文分析系统做图像分析, 记录光密度值 (AU) 及阳性细胞占总面积的百分比。

3 统计学方法 各组数据之间的比较采用 SPSS 分析软件, 进行方差分析。

结 果

1 3 组大鼠胃黏膜肌层缺损宽度及再生黏膜厚度测量结果 见表 1。中药组胃黏膜肌层缺损宽度小于模型组及雷尼替丁组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 雷尼

替丁组胃黏膜肌层缺损宽度与模型组比较差异有显著性 ($P<0.01$)。中药组大鼠再生胃黏膜厚度大于模型组及雷尼替丁组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 3 组大鼠胃黏膜肌层缺损宽度及再生黏膜厚度测定结果比较 (μm $\bar{x} \pm s$)

组别	n	胃黏膜肌层缺损宽度	再生胃黏膜厚度
模型	8	236.76 ± 42.40	29.59 ± 5.00
雷尼替丁	8	165.86 ± 55.95 *	33.93 ± 6.96
中药	8	120.14 ± 20.05 * △	43.14 ± 9.00 * △

注: 与模型组比较, * $P<0.01$; 与雷尼替丁组比较, △ $P<0.05$

2 各组大鼠胃黏膜组织 EGF 含量的测定结果 见表 2。与空白组比较, 模型组、雷尼替丁组、中药组 EGF 含量均明显增高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 雷尼替丁组、中药组含量均明显增高 ($P<0.01$); 雷尼替丁组与中药组比较, EGF 含量差异无显著性。

3 各组大鼠血清 EGF 含量的测定结果 见表 2。与空白组比较, 模型组、雷尼替丁组和中药组血清 EGF 均增高 ($P<0.05$ 或 $P<0.05$), 且中药组高于模型组 ($P<0.05$); 与雷尼替丁组比较, 中药组虽有增加趋势, 但差异无显著性。

表 2 各组大鼠胃黏膜组织和血清 EGF 含量测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EGF	
		胃黏膜组织 (ng/g)	血清 (μg/L)
空白	8	22.99 ± 4.67	0.55 ± 0.08
模型	8	33.34 ± 8.47 *	0.68 ± 0.16 *
雷尼替丁	8	49.27 ± 9.29 ** △△	0.71 ± 0.20 *
中药	8	58.00 ± 12.72 ** △△	0.83 ± 0.10 ** △

注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$

4 免疫组织化学观察

4.1 各组大鼠胃黏膜 EGFR 表达结果 空白组大鼠胃黏膜 EGFR 表达分布在胃腺颈部、基底部, 以弱阳性为主, 定位于胃黏膜的壁细胞、颈黏液细胞的胞浆及胞膜, 但以后者为主。其余各组观察距溃疡边缘 2mm 范围内黏膜层 EGFR 表达增强。结果模型组、雷尼替丁组和中药组 EGFR 表达强于空白组, 中药组比模型组黏膜层 EGFR 蛋白表达更强。

4.2 各组大鼠胃黏膜 EGFR 表达图像分析结果 见表 3。与空白组比较, 模型组、雷尼替丁组和中药组 EGFR 光密度值及阳性细胞占总面积的百分比增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 中药组及雷尼替丁组阳性细胞占总面积的百分比比模型组增加 ($P<0.05$), 中药组光密度值又比模型组高 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠胃黏膜 EGFR 表达图像
分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	面积百分比 (%)	光密度值
空白	6	10.43 ± 3.84	0.72 ± 0.22
模型	6	19.83 ± 5.76 **	1.48 ± 0.72 *
雷尼替丁	6	26.61 ± 6.23 ** △	2.13 ± 0.90 **
中药	6	27.40 ± 8.76 ** △	2.41 ± 0.70 ** △

注 :与空白组比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较 , △ $P < 0.05$

讨 论

Tarnawski 等^[3]首先提出了 QOUH 的概念 ,认为溃疡的愈合不仅需要黏膜缺失的修复 ,更需要黏膜下组织结构的修复重建。评价溃疡愈合的情况不仅仅是内镜或直视下对浅表再生黏膜的观察 ,还应了解黏膜下组织重建的情况 ,评价 QOUH 不仅要评价溃疡局部再生黏膜结构成熟度 ,更应重视其功能成熟度 ,并以此判定其对未来溃疡复发的影响及评价药物对溃疡的疗效。因此 ,QOUH 成为目前溃疡病研究的热点课题。本研究发现健脾化瘀中药可以使再生黏膜厚度增加 ,黏膜肌层缺损宽度减少 ,说明有促进上皮组织再生和改善瘢痕修复能力的作用 ,有提高再生黏膜结构成熟度的作用 ,且优于雷尼替丁 ,所以说提高 QOUH 可能是健脾化瘀中药抗消化性溃疡复发的机制之一。

EGF 为一种含 53 个氨基酸的单链多肽 ,其与特异性的细胞表面受体 EGFR 有高度亲和力 ,当 EGF 到达靶细胞表面时 ,很快与细胞膜上 EGFR 结合 ,诱导其产生某种变构 ,形成受体二聚体 ,激活受体膜内区域的酪氨酸蛋白激酶 ,使自身的一系列酪氨酸被磷酸化 ,通过 Grb2 和 Sos 最终激活 P21ras ,而传导信号 ,调节细胞生长与分化^[4] ,是调节溃疡愈合重要的中介因子^[5,6]。有报道当血液循环中的 EGF 与该受体结合后 ,可产生抑制胃酸分泌的效应 ,而胃液中 EGF 则能刺激上皮细胞增殖和形成细胞保护作用 ,Abe 等^[7]发现在胃黏膜损伤的急性期 EGF 表达并没有增加 ,且在胃溃疡周围的新生组织中 EGF 含量也没有增加。我们研究与此不同 ,发现胃黏膜组织含一定量的 EGF ,且模型组比空白组高 ,中药组比模型组更高 ,说明健脾化瘀中药可刺激腺上皮细胞分泌 EGF ,并且通过显著增加 EGF 含量 ,加速溃疡的愈合。另外 ,我们发现大鼠血清、胃黏膜组织 EGF 水平与胃黏膜 EGFR 的表达有同步性 ,且与胃溃疡愈合质量一致 ,进一步说明 EGF 与 EGFR 的有效结合 ,增加了细胞内 DNA、RNA 和蛋白质合成 ,抑制了胃酸的分泌 ,增加了胃黏膜血流量^[8] ,从而提高了胃溃疡的愈合质量。发挥了抗溃疡

万方数据

作用 ,且优于雷尼替丁。有人在抗实验性溃疡复发的研究中发现 ,硫酸铝在一定的 pH 值内能诱导和激活 EGF 及其 EGFR ,将 EGF 固定在溃疡区域并使其聚集 ,增加 EGFR 在溃疡处黏膜的表达^[9] ,从而提高 QOUH。本实验观察到健脾化瘀中药可明显提高胃溃疡大鼠的血清及胃黏膜组织的 EGF 含量及胃溃疡边缘上皮细胞表达 EGFR ,由此推测健脾化瘀中药提高胃溃疡愈合质量可能是由受体介导的 ,同时表明健脾化瘀中药可通过促进或稳定胃黏膜上皮细胞膜 EGFR 水平来促进胃溃疡愈合。

参 考 文 献

- 1 梅武轩 ,邓兰琼 ,崔世高 .柴胡桂枝汤对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响 .中国中西医结合脾胃杂志 2000 ;8(5):278—280.
Mei WX , Deng LQ , Cui SG. Effect of Chaihu Guizhi decoction on quality of ulcer healing in gastric ulcerated rats. Chin J Integr West Med Gastro-spleen 2000 ;8(5):278—280.
- 2 张叔行 ,陈 玲 ,陈东明 ,等 .大鼠胃溃疡模型的制作方法 .解剖学杂志 1989 ;10(2):158—159.
Zhang SH , Chen L , Chen DM , et al. Making method of gastric ulcer model in rats. Chin J Anat 1989 ;10(2):158—159.
- 3 Tarnawski A , Hollander D , William JK , et al. “ Healed ” experimental gastric ulcers remain histologically and ultrastructurally abnormal. J Clin Gastroenterol 1990 ;12(Suppl 1):s139—s147.
- 4 Egan SE , Barton WG , Mary WB , et al. Association of Sos rats exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. Nature 1993 ;363(6424):45—51.
- 5 Szabo S , Kusstatscher S , Sandor Z , et al. Molecular and cellular basis of ulcer healing. Scand J Gastroenterol 1995 ;30(Suppl 1):42.
- 6 Chen XG , Zhang WD , Jiang B , et al. Reduced secretion of epidermal growth factor in duodenal ulcer patients with hepicoacter pylori infection. Chin Natl J New Gastroenterol 1997 ;3(1):31.
- 7 Abe S , Sasano H , Katoh K. Immunohistochemical studies on EGF family growth factors in normal and ulcerated human gastric mucosa. Dig Dis Sci 1997 ;42(6):1199—1209.
- 8 贺建华 .生长因子在消化性溃疡愈合中的作用 .国外医学·消化系统疾病分册 2003 ;23(1):12—15.
He JH. Role of growth factor in the peptic ulcer healing. Foreign Med(Section of Digestive Disease) 2003 ;23(1):12—15.
- 9 Tarnawski A , Tanouo K , Santos AM , et al. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? Scand J Gastroenterol 1995 ;210:9.