

复方中药安胃汤提高大鼠胃溃疡愈合质量的机制

林寿宁, 韦 维, 黄贵华

林寿宁, 广西中医学院瑞康医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530011

韦维, 黄贵华, 广西中医学院 广西壮族自治区南宁市 530001
林寿宁, 教授, 硕士生导师, 主要从事消化系统疾病的临床和实验研究。

通讯作者: 林寿宁, 530011, 广西壮族自治区南宁市市华东路10号, 广西中医学院瑞康医院消化内科. lsn77766@sina.com

电话: 0771-2188105 传真: 0771-3137377

收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-05-11

Effect of Anweitang on gastric ulcer and its mechanism in experimental rats

Shou-Ning Lin, Wei Wei, Gui-Hua Huang

Shou-Ning Lin, Department of Gastroenterology, Ruikang Affiliated hospital of Guangxi TCM University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wei Wei, Gui-Hua Huang, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Shou-Ning Lin, Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lsn77766@sina.com

Received: 2006-04-20 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of *Anweitang* in the improvement of gastric ulcer healing quality.

METHODS: Forty Wistar rats were randomly and averagely divided into group A, B, C and D. Acetic acid was used to establish the model of gastric ulcer in the rats of group B, C and D. The rats in group A and B were treated (ig) with normal saline while those in group C and D were treated (ig) with *Anweitang* and Ranitidine, respectively. Radioimmunoassay was used to determine the expression of serum epidermal growth factor (EGF), and immunohistochemistry was applied to detect the expression of EGF, EGF receptor, and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in the gastric mucosa.

RESULTS: In comparison with that in the group B, the expression of serum EGF was evidently enhanced in group C and D (1.12 ± 0.24 , 0.99

± 0.15 $\mu\text{g/L}$ vs 0.52 ± 0.13 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), and serum EGF expression was also significantly different between group C and D ($P < 0.01$). Furthermore, the expression of mucosal EGF, EGFR and TGF- β_1 were markedly higher in group C and D than those in group B (EGF: $29.7\% \pm 1.9\%$, $26.5\% \pm 1.6\%$ vs $18.4\% \pm 2.0\%$, $P < 0.01$; EGFR: $29.6\% \pm 2.6\%$, $25.9\% \pm 1.0\%$ vs $20.4\% \pm 1.8\%$, $P < 0.01$; TGF- β_1 : $67.0\% \pm 2.0\%$, $49.5\% \pm 1.1\%$ vs $27.3\% \pm 1.0\%$, $P < 0.01$). There were also significant differences between group C and D in the expression of mucosal EGF, EGFR and TGF- β_1 (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: *Anweitang* may improve the healing quality of gastric ulcer by enhancing the expression serum EGF and mucosal EGF, EGFR, and TGF- β_1 .

Key Words: *Anweitang*; Epidermal growth factor; Epidermal growth factor receptor; Transforming growth factor- β_1

Lin SN, Wei W, Huang GH. Effect of *Anweitang* on gastric ulcer and its mechanism in experimental rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1771-1774

摘要

目的: 通过实验性乙酸大鼠胃溃疡模型, 研究复方中药安胃汤提高慢性胃溃疡愈合质量机制。

方法: 40只Wistar大鼠随机平均分为正常对照组、模型组、安胃汤组和雷尼替丁。采用乙酸浸渍法建立胃溃疡模型, 造模3 d后前两组分别用生理盐水灌胃, 后两组分别用安胃汤和雷尼替丁灌胃。采用放射免疫方法和免疫组织化学方法观察复方中药安胃汤对大鼠胃溃疡模型愈合时血清表皮生长因子(EGF)和胃黏膜EGF, 表皮生长因子受体(EGFR)及转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的影响。

结果: 模型组相比, 安胃汤组和雷尼替丁组可提高血清EGF(1.12 ± 0.24 , 0.99 ± 0.15 $\mu\text{g/L}$ vs 0.52 ± 0.13 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组相比差异也有显著意义($P < 0.05$)。与

■背景资料

提高慢性胃溃疡愈合质量是目前胃溃疡研究的重点和难点, 目前很多学者运用中医药方法提高慢性胃溃疡愈合质量取得较好的临床效果, 但其机制有待进一步的研究。

■研发前沿

复方中药对在体动物模型血清EGF和胃黏膜EGF, EGFR及TGF- β_1 表达的影响是近期提高慢性胃溃疡愈合质量机制的研究热点。

■相关报道

通过整理林沛湘教授治疗慢性胃病临床经验, 对其治疗慢性胃病的学术理论进行了归纳总结, 认为本病的基本病机为多属寒热虚实夹杂, 气血失和占大多数, 气机阻滞、升降失调是其共同特征。

模型组相比, 安胃汤组和雷尼替丁组可显著增强胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 表达(EGF: $29.7\% \pm 1.9\%$, $26.5\% \pm 1.6\%$ vs $18.4\% \pm 2.0\%$, $P < 0.01$; EGFR: $29.6\% \pm 2.6\%$, $25.9\% \pm 1.0\%$ vs $20.4\% \pm 1.8\%$, $P < 0.01$; TGF- β_1 : $67.0\% \pm 2.0\%$, $49.5\% \pm 1.1\%$ vs $27.3\% \pm 1.0\%$, $P < 0.01$), 安胃汤组强于雷尼替丁组(均 $P < 0.01$)。

结论: 安胃汤可能通过提高血清EGF和增强胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 表达, 增强胃黏膜保护作用而提高溃疡愈合质量。

关键词: 安胃汤; 表皮生长因子; 表皮生长因子受体; 转化生长因子 β_1

林寿宁, 韦维, 黄贵华. 复方中药安胃汤提高大鼠胃溃疡愈合质量的机制. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1771-1774
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1771.asp

0 引言

复方中药安胃汤是在全国著名老中医、广西中医学院林沛湘教授治疗慢性胃病验方基础上组方而成, 临床疗效显著^[1]. 我们分别采用放射免疫方法和免疫组织化学方法观察该方对实验性乙酸大鼠胃溃疡愈合时血清表皮生长因子(EGF)及胃黏膜表皮生长因子(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的影响, 探讨其提高慢性胃溃疡愈合质量的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠40只, 雌雄各半, 体重 180 ± 50 g, 广西中医学院实验动物中心提供. 安胃汤中药颗粒剂(由江苏江阴天江药业有限公司生产)药物组成黄连5 g, 干姜5 g, 制半夏10 g, 百合15 g, 乌药10 g, 丹参15 g, 白芍15 g, 薏苡仁15 g, 木香7 g, 甘草5 g. 雷尼替丁胶囊(江苏晨牌药业有限公司出品). 链霉菌抗生素蛋白-过氧化酶免疫组织化学染色超敏试剂盒(Ultrassensitire™ S-P kit-9710, 福建迈新公司); 液体DAB酶底物显色试剂盒, 美国Matim Biotech. Inc公司产品, 按照试剂盒说明书制备和使用. 0.01 mol/L PBS (pH 7.2)(粉剂), 福州迈新生物技术开发公司产品. EGF, EGFR, TGF- β_1 免疫组织化学染色抗体试剂盒(福建迈新公司提供). EGF放射免疫分析盒(中国原子能科学研究所提供). HB-2型奥林巴斯显微照相系统、英国珊顿切片机、Motic images软件系统. 721分光光度计(上

表 1 胃溃疡大鼠胃黏膜再生血清EGF(mean \pm SD, $n = 10$)

分组	再生黏膜厚度(μ m)	黏膜肌层缺损度(μ m)	血清EGF(μ g/L)
模型	257 ± 18	250 ± 37	0.52 ± 0.13
雷尼替丁	329 ± 15^b	185 ± 23^b	0.99 ± 0.15^b
安胃汤	343 ± 16^{bc}	153 ± 25^{bc}	1.12 ± 0.24^{bc}
正常对照			0.67 ± 0.06^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型; ^c $P < 0.05$ vs 雷尼替丁.

海精密仪器有限公司), FJ2003/50p γ 放射免疫计数器(国营二六二厂).

1.2 方法 Wistar大鼠40只称质量, 标记, 完全随机分为4组, 每组10只, 除正常对照组外, 其余3组按照醋酸浸渍法^[2]造模, 造模后3 d开始治疗, 雷尼替丁溶液浓度为3 g/L, 安胃汤2.5 kg/L, 按10 mL/kg灌胃, 1次/d; 正常对照组、模型组生理盐水10 mL/kg灌胃, 1次/d. 每组均连续灌胃13 d后停药, 各组大鼠禁食24 h, 断头处死取血, 静置2-3 h后分离血清, 置EP管中, -20°C 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40 g/L中性甲醛中固定24 h. 按照常规脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 5 μ m厚度, 以瘢痕的最长径为中心连续切片. 再生黏膜厚度及黏膜肌缺损宽度测定: 参照杨雪松 *et al*^[3]方法, 在HE染色的切片上, 用低倍镜找到溃疡部位, 在高倍镜下(40倍物镜)观察测量, 取5个视野测量计算平均值. 血清EGF的测定: 采用放射免疫法, 严格按照试剂盒说明书步骤操作, SP免疫组织化学染色操作程序按照试剂盒说明书进行. SP免疫组织化学染色检测结果判定: 细胞质或细胞膜呈现棕黄色颗粒为阳性表达. 运用计算机图像分析仪定量测定, 每组随机抽取5只大鼠切片各1张, 每张随机选取5个视野作图像分析, 以每个像素点0.389 μ m长, 在 $4.306 \mu\text{m} \times 104 \mu\text{m}$ 测量窗下测量并记录积分吸光度值(AU)及阳性细胞占总面积百分比。

统计学处理 所有资料均用mean \pm SD表示, 多组均数比较采用ANOVA检验。

2 结果

2.1 再生黏膜厚度和黏膜肌层缺损度 安胃汤组与雷尼替丁组均较模型组明显增加再生黏膜厚度($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有

表 2 胃溃疡大鼠胃黏膜EGF, EGFR, TGF- β_1 表达 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	EGF		EGFR		TGF- β_1	
	积分吸光度值	阳性率 (%)	积分吸光度值	阳性率 (%)	积分吸光度值	阳性率 (%)
模型	32.9 \pm 1.8	18.4 \pm 2.0	1.19 \pm 0.07	20.4 \pm 1.8	92.0 \pm 2.1	27.3 \pm 1.0
雷尼替丁	48.7 \pm 1.2 ^b	26.5 \pm 1.6 ^b	1.51 \pm 0.06 ^b	25.9 \pm 1.0 ^b	80.6 \pm 2.3 ^b	49.5 \pm 1.1 ^b
安胃汤	60.5 \pm 1.9 ^{bd}	29.7 \pm 1.9 ^{bd}	1.77 \pm 0.13 ^{bd}	29.6 \pm 2.6 ^{bd}	72.6 \pm 1.9 ^{bd}	67.0 \pm 2.0 ^{bd}
正常对照	20.9 \pm 1.7 ^b	10.4 \pm 1.8 ^b	0.91 \pm 0.06 ^b	15.8 \pm 0.9 ^b	121.8 \pm 5.1 ^b	8.5 \pm 0.6 ^b

^b $P < 0.01$ vs 模型; ^d $P < 0.01$ vs 雷尼替丁.

显著意义($P < 0.05$); 安胃汤组和雷尼替丁组均能较模型组明显减少黏膜肌层缺损度($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有显著性意义($P < 0.05$, 表1).

2.2 大鼠血清EGF 安胃汤组和雷尼替丁组均能较模型组和正常对照组明显增加大鼠胃溃疡血清EGF水平($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有显著意义($P < 0.05$, 表1).

2.3 胃溃疡大鼠黏膜EGF表达 正常对照组大鼠EGF的表达为弱阳性, 定位于细胞质, 主要集中在胃腺颈部, 阳性表达以胃黏膜的壁细胞、颈部细胞为主. 模型组、雷尼替丁组和安胃汤组溃疡边缘组织阳性表达的细胞逐渐增多, 强阳性表达细胞可见. 雷尼替丁组和安胃汤组表达强于模型组及正常对照组($P < 0.01$), 安胃汤组表达强于雷尼替丁组($P < 0.01$, 表2).

2.4 胃溃疡大鼠黏膜EGFR表达 正常对照组大鼠胃黏膜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、颈黏液细胞的胞质及胞膜, 但以后者为主. 其余各组观察距溃疡边缘2 mm范围内黏膜层EGFR表达增强. 安胃汤组和雷尼替丁组均能较模型组和正常对照组明显增加大鼠胃溃疡EGFR的图像分析积分光密度、百分比($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有显著意义($P < 0.01$, 表2).

2.5 胃溃疡大鼠黏膜TGF- β_1 表达 正常对照组大鼠TGF- β_1 的表达为弱阳性, 定位于细胞质, 在胃腺颈部、基底部都有表达, 阳性表达以胃黏膜的壁细胞、颈部细胞为主. 模型组、雷尼替丁组和安胃汤组溃疡边缘组织阳性表达的细胞逐渐增多, 强阳性表达细胞可见. 雷尼替丁组和安胃汤组表达强于模型组及正常对照组($P < 0.01$), 安胃汤组表达强于雷尼替丁组($P < 0.01$, 表2).

3 讨论

本结果表明, 安胃汤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, 且安胃汤组优于雷尼替丁组($P < 0.05$). EGF是一种重要的生物活性肽, 不仅在血液中能检出, 还广泛存在消化道内, 能抑制胃酸分泌和促进组织、细胞内DNA、RNA及蛋白质的合成, 加速适应性溃疡的愈合^[4]. 同时EGF具有促进上皮增殖, 组织修复和细胞保护作用, 在保护胃黏膜免受损伤因子破坏, 维持胃肠黏膜完整性方面起着非常重要的作用^[5], 这些作用是由EGFR介导的. 人及其他哺乳动物的胃肠道广泛存在EGFR, 以黏膜层的含量较高, 胃黏膜受到损伤时(如溃疡), 其黏膜层EGFR表达大量增加^[6], EGFR的增加除了介导黏膜上皮细胞的分裂、修复外, 还介导减少胃酸的分泌^[7]. 本组结果显示, 安胃汤和雷尼替丁治疗后, 安胃汤能显著增加血清EGF水平, 胃溃疡周围EGF和EGFR表达增强, 说明安胃汤可刺激腺上皮细胞分泌EGF, 并且通过显著增加胃溃疡周围EGF和EGFR表达, 加速溃疡的愈合. 另外, 我们发现大鼠胃黏膜组织EGF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, 从而提高了胃溃疡的愈合质量, 发挥了抗溃疡作用, 且安胃汤优于雷尼替丁($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). 我们观察到安胃汤增强胃溃疡周围组织的EGF及胃溃疡边缘上皮细胞EGFR的表达, 由此推测安胃汤提高胃溃疡愈合质量可能是由受体介导的, 同时表明安胃汤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的.

TGF- β 为多功能的多肽生长因子, 哺乳动物的TGF- β 有 β_1 , β_2 , β_3 三种亚单位, 其中以TGF- β_1 的含量最高, 作用最重要^[8], 其在溃疡病中, 除

■创新盘点

本文应用在体动物模型, 深入、系统地 从血清EGF、胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β 探讨中药治疗慢性胃溃疡的作用机制, 从细胞分子水平上阐释名老中医学术理论的科学性, 为更好的研究和继承提供新的思路.

■应用要点

本研究为将复方中药安胃汤开发成防治慢性胃溃疡的中药新药提供理论和基础实验依据. 该项目预期成果将有益于广大消化性溃疡患者的治疗和提高溃疡愈合质量. 临床应用还表明该方治疗费用经济, 仅为国内现投入于临床应用同类抗溃疡中成药费用的1/3.

■同行评价

本文讨论了安胃汤对乙酸所致胃溃疡模型的干预与治疗作用,方法尚可行,科学性、先进性较好,但于本量小和方法稍显单一。

作为化学趋化剂趋化炎症细胞与组织修复细胞向创面聚集外,本身还能直接作用于成纤维细胞、刺激细胞外基质(ECM)中I型前胶原合成、肉芽组织生长及修复后期的组织改建^[9]。本结果显示,正常组胃黏膜层、黏膜下层和肌层即有较弱的TGF- β_1 表达,实验性胃溃疡愈合时,除正常组外TGF- β_1 的表达都增高,其阳性染色可见于肉芽组织,故推测TGF- β_1 可能通过自分泌和旁分泌的方式参与炎症细胞和成纤维细胞的迁移,由此诱导肉芽组织的形成,从而在胃溃疡组织的重建中起重要作用。

血清EGF水平和胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 的表达同属增强黏膜保护因子,本实验研究发现大鼠血清EGF水平和胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 的表达与溃疡愈合呈正相关,以此我们推测,安胃汤可能通过提高血清EGF水平和增强胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 的表达而促进溃疡愈合,可能是安胃汤提高溃疡愈合质量的重要机制。

4 参考文献

- 1 林寿宁. 中医临床家-林沛湘. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 99-117
- 2 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1333-1334
- 3 杨雪松, 李益农, 叶嗣懋, 董秀云. 大鼠胃溃疡愈合质量与抗强的松再损伤关系的实验研究. 北京医科大学学报 1996; 28: 454-456
- 4 许春娣. 表皮生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学儿科学分册 1997; 24: 123-126
- 5 Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Ernst H. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: role in protection and healing of gastric mucosal lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 933-937
- 6 Tarnawski A, Stachura J, Durbin T, Sarfeh IJ, Gergely H. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 1992; 102: 695-698
- 7 Joshi V, Ray GS, Goldenring JR. Inhibition of parietal cell acid secretion is mediated by the classical epidermal growth factor receptor. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1194-1198
- 8 Takenoshita S, Fukushima T, Kumamoto K, Iwade M. The role of TGF- β in digestive organ disease. *Gastroenterology* 2002; 37: 991-999
- 9 Lempinen M, Inkinen K, Wolff H, Ahonen J. Connective tissue growth factor in indomethacin-induced rat gastric ulcer. *Eur Surg Res* 2002; 34: 232-238

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文

本刊讯 中华医学会外科学分会胰腺外科学组定于2006-09-08/11在西部高原城市青海省西宁市举行第十一届全国胰腺外科学术研讨会,届时将邀请全国普外科百位知名专家到会就胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范进行专题讨论,欢迎全国普外科同仁参加此次研讨会,共同商定我国胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范。

投稿及联系事项: 北京协和医院基本外科, 李丽君. 截稿日期2006-06-30. 通信地址: 北京市东城区王府井大街帅府园1号, 邮编: 100730. 联系电话: 010-65296021, 010-65296016; 传真: 010-65296021.