

清热化湿舒胃方对幽门螺旋杆菌感染小鼠体内NO和胃组织iNOS表达的影响

陈智龙, 吕永慧, 王玘, 涂星

陈智龙, 广州中医药大学附属广州市中医医院 广东省广州市 510405
 吕永慧, 广州市中医医院脾胃科 广东省广州市 510130
 王玘, 广州中医药大学中药学院 广东省广州市 510006
 涂星, 广州中医药大学第一附属医院药学部 广东省广州市 510405

陈智龙, 在读博士, 主要从事中医内科学消化病研究。

作者贡献分布: 吕永慧主要完成课题的设计与指导, 参与全部研究过程, 提供实验所需经费, 论文的撰写与修改; 陈智龙负责动物造模、取材及数据处理与分析, 论文的撰写; 王玘负责观测指标分析和测定, 论文的修改; 涂星负责实验相关资料收集与论文修改。

通讯作者: 吕永慧, 教授, 主任医师, 510130, 广东省广州市荔湾区珠玑路16号, 广州市中医医院脾胃科. scaltor@163.com
 电话: 020-81226141

收稿日期: 2014-12-02 修回日期: 2014-12-24

接受日期: 2014-12-30 在线出版日期: 2015-02-18

Effects of Qingre Huashi Shuwei Fang on serum nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in gastric tissue in mice with *Helicobacter pylori* infection

Zhi-Long Chen, Yong-Hui Lv, Ding Wang, Xing Tu

Zhi-Long Chen, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Yong-Hui Lv, Department of Spleen and Stomach, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China

Ding Wang, School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Xing Tu, Pharmaceutical Department, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yong-Hui Lv, Professor, Chief Physician, Department of Spleen and Stomach, Guangzhou

Hospital of Traditional Chinese Medicine, 16 Zhuji Road, Liwan District, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China. scaltor@163.com

Received: 2014-12-02 Revised: 2014-12-24

Accepted: 2014-12-30 Published online: 2015-02-18

Abstract

AIM: To observe the effects of Qingre Huashi Shuwei Fang on the content of nitric oxide (NO) in blood and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gastric tissue in mice with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection.

METHODS: After the successful induction of *H. pylori* infection in mice, the model mice were treated with Qingre Huashi Shuwei Fang, triple therapy (amoxicillin, esomeprazole sodium and clarithromycin), or Qingre Huashi Shuwei Fang combined with triple therapy. Non-treated model rats or normal rats were used as controls. After treatment, the content of NO in blood was determined by the Griess method, and the expression of iNOS in gastric tissue was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: In the model group, chronic inflammation in gastric tissue was observed, and the content of NO in blood and the expression of iNOS in gastric tissue increased significantly. The content of NO in blood and the expression of iNOS were significantly decreased in the Qingre Huashi Shuwei Fang group. The *H. pylori* eradication in the Qingre Huashi Shuwei Fang combined with triple therapy group was better than that in the triple therapy group.

CONCLUSION: Qingre Huashi Shuwei Fang

□背景资料
 幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 在全世界范围感染率超过50%, 我国平均感染率为55%。目前大量的研究证实*H. pylori*与慢性胃炎、胃溃疡、胃癌的发生、发展有密切关系, 是极其重要的始动因素。

□同行评议者
 陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

研究前沿

目前研究多集中于开发清除*H. pylori*更优方案. 现临床上主流的采用三联抗生素疗法存在患者依从性差、不良反应大和抗生素耐药等缺点. 而中药复方因其具有不良反应小, 耐药性少, 不会引起肠道菌群失调等优势, 正成为辅助根除*H. pylori*的研究热点.

can reduce gastric mucosal injury caused by *H. pylori* infection, and this may have a relationship with its negative effect on the expression and release of iNOS in gastric tissue.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *Helicobacter pylori*; iNOS; NO; Qingre Huashi Shuwei Fang

Chen ZL, Lv YH, Wang D, Tu X. Effects of Qingre Huashi Shuwei Fang on serum nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in gastric tissue in mice with *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(5): 711-718 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/711.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i5.711>

摘要

目的: 观察清热化湿舒胃方对KM小鼠感染幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)动物模型血清中一氧化氮(nitric oxide, NO)含量和胃组织中诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的影响.

方法: 在复制KM小鼠*H. pylori*感染模型的基础上, 分为清热化湿舒胃方组、三联抗生素治疗组、清热化湿舒胃方结合三联抗生素组和模型对照组, 并分别进行干预和治疗. 治疗结束后采用硝酸还原酶法测定各组小鼠血清中的NO含量, 采用免疫组织化学法测定各组小鼠胃组织中iNOS的表达量.

结果: 所建立的*H. pylori*感染小鼠模型出现*H. pylori*在胃组织大量定植并造成胃黏膜慢性炎症损伤, 体内NO含量和胃组织iNOS表达显著升高; 清热化湿舒胃方干预后胃黏膜慢性炎症评分、体内NO含量和胃组织iNOS表达显著降低, 其与三联抗生素联用对*H. pylori*的根除效果优于单用三联抗生素.

结论: 清热化湿舒胃方具有修复*H. pylori*感染所致胃黏膜炎症损伤的作用, 其机制可能与降低胃组织iNOS活性表达和体内NO释放有关.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 幽门螺旋杆菌; 诱导性一氧化氮合酶; 一

氧化氮; 清热化湿舒胃方

核心提示: 本实验对比清热化湿舒胃方与三联抗生素及二者联合用药对幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)感染小鼠根除率及其胃黏膜中一氧化氮(nitric oxide)及诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase)水平的影响. 进一步揭示了清热化湿舒胃方修复胃黏膜的作用机制, 为清热化湿舒胃方的临床应用与推广提供了实验依据与理论支持.

陈智龙, 吕永慧, 王玎, 涂星. 清热化湿舒胃方对幽门螺旋杆菌感染小鼠体内NO和胃组织iNOS表达的影响. *世界华人消化杂志* 2015; 23(5): 711-718 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/711.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i5.711>

0 引言

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡的重要致病因素之一^[1,2], 其在胃窦部位定植后迅速繁殖并释放各种毒素, 直接引起黏膜上皮细胞的损害并激活炎症细胞使黏膜的炎症反应加重, 导致溃疡的形成^[3,4]. 有研究^[5-7]表明, 一氧化氮(nitric oxide, NO)在这一过程中起到不可忽视的作用, 且*H. pylori*感染可引起胃黏膜上皮细胞中诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性增强. 清热化湿舒胃方主要由姜厚朴、佩兰、蒲公英、广藿香、紫苏梗等11味药物组成, 前期研究^[8]表明其对*H. pylori*感染所致的胃炎具有一定的临床疗效, 但其作用机制尚不明确. 本研究拟采用*H. pylori*感染的KM小鼠作为研究对象, 探讨清热化湿舒胃方单用及与三联抗生素合用时对模型小鼠血清中NO的含量和胃组织中iNOS的表达量的影响, 初步探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 66只KM小鼠, SPF级, 体质量35 g±5 g, 6-8周龄, 雌雄各半, 购自广州中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤)2013-0020. 实验操作在广州中医药大学第一附属医院实验中心SPF级动物实验设施中完成, 许可证号: SYXK(粤)2013-0092.

S II 悉尼*H. pylori*菌株(澳大利亚悉尼大学微生物实验室). 注射用乳糖酸阿奇霉素(批号: B130600812, 哈药集团制药总厂); 克拉霉

素分散片(批号: 0081401003, 宜昌长江药业有限公司); 阿莫西林胶囊(批号: 40300201, 珠海联邦制药股份有限公司); 埃索美拉唑镁肠溶片(批号: 1405127, 阿斯利康制药有限公司). 清热化湿舒胃方水煎液: 取姜厚朴、佩兰、蒲公英、广藿香、紫苏梗、枳壳、茯苓、白术、熟党参、黄芩、甘草11味药, 加双蒸水清洗3次, 再加水煎煮20 min去渣, 于60 °C水浴中浓缩成1 kg/L的流浸膏, 1000 r/min离心5 min, G4过滤, 密封后隔水煮沸消毒, 4 °C冰箱保存备用. 一氧化氮试剂盒(南京建成生物工程研究所), 一氧化氮合酶试剂盒(福州迈新生物技术有限公司). 兔抗鼠多克隆抗体(日本株式会社同仁化学研究所).

Leika1900冰冻及石蜡切片机(德国Leika公司), OLYMPUS CHC型光学显微镜(日本OLYMPUS光学工业株式会社), Motic数码显微镜(厦门Motic实业有限公司), Sartorius AA-160型电子读数天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 雷磁pHST-4A pH计(上海精密科学仪器有限公司).

1.2 方法

1.2.1 试液的配制: 抗生素混合液的配制: 精密称取500 mg氨苄青霉素溶液、100 mg庆大霉素溶液和1250 mg阿奇霉素, 以无菌生理盐水稀释并定容至25 mL, 4 °C下保存. 埃索美拉唑镁溶液: 埃索美拉唑镁肠溶片研成细粉, 精密称取20 mg, 以无菌生理盐水稀释并定容至50 mL, 4 °C下保存. 克拉霉素溶液: 克拉霉素分散片研成细粉, 精密称取250 mg, 以无菌生理盐水稀释并定容至20 mL, 4 °C下保存. 阿莫西林溶液: 精密称取阿莫西林胶囊内容物500 mg, 以无菌生理盐水稀释并定容至25 mL, 4 °C下保存.

1.2.2 *H. pylori*菌株及培养: 采用含有VacA和CagA的国际标准菌株S II, 采用布氏肉汤, 改良Skirrow培养基于厌氧箱中37 °C微需氧(5%O₂, 10%CO₂, 85%N₂)培养7 d. 并采用革兰氏染色法、尿素酶试验和过氧化氢酶试验进行鉴别. 鉴别后用无菌接种环从培养基上收集*H. pylori*菌落于无菌生理盐水中制成混悬液, 比浊法调整混悬液浓度为1×10⁹ CFU/mL.

1.2.3 *H. pylori*感染小鼠模型的制备和药物干预: 66只KM小鼠随机分为*H. pylori*模型组4组($n = 54$)和正常组($n = 12$), 共5组. 模型组

小鼠第1-3天每天灌胃抗生素混合液0.5 mL/只; 从第4天起, 每天禁食12 h后, 灌胃现配*H. pylori*混悬液0.5 mL/只, 连续7 d. 正常组小鼠每天灌胃无菌生理盐水0.5 mL/只. 造模结束后模型组有两只小鼠死亡, 将剩余52只*H. pylori*感染小鼠随机分为*H. pylori*感染模型组(model group, MG, $n = 12$)、中药组(Chinese medicine group, CG, $n = 12$)、三联抗生素组(triple therapy group, TG, $n = 14$)、中药组+三联抗生素组(CTG, $n = 14$)4组. CG组小鼠每天灌胃清热化湿舒胃方水煎剂0.8 mL; TG组小鼠每天灌胃0.13 mL埃索美拉唑溶液、0.13 mL阿莫西林溶液和0.104 mL克拉霉素溶液; CTG组每天灌胃0.13 mL埃索美拉唑溶液、0.13 mL阿莫西林溶液和0.104 mL克拉霉素溶液, 2 h后再灌胃清热化湿舒胃方水煎剂0.8 mL; MG组和正常组(normal group, NG)每天灌胃无菌生理盐水0.8 mL, 给药周期为14 d. 末次给药后4 h, 各组小鼠腹腔注射10%水合氯醛麻醉, 腹腔主动脉采血, 所采的血液存于Ep管内, 1000 r/min离心5 min后取上清液, 并做好标记, 备用. 取血完毕后的各组小鼠, 取出胃, 沿胃大弯剪开, 用无菌生理盐水冲洗残留物后取完整的胃组织切为2部分, 做好标记, 备用.

药物干预阶段, 小鼠三联抗生素治疗方案参照2012年《第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》^[9]中标准三联药物用量, 经成人与小鼠体表面积比例换算得出.

1.2.4 *H. pylori*定植情况的判断和胃黏膜慢性炎症评分: 取一部分胃组织, 采用革兰染色涂片镜检、尿素酶试验和过氧化氢酶试验. 3种检测方法中只要有两种为阳性即认定小鼠胃黏膜有*H. pylori*感染, 只有1种阳性为可疑感染, 但不计算在内, 3项阴性者诊断为无*H. pylori*感染. 剔除可疑感染和无*H. pylori*感染的各组小鼠的血清和胃组织. 将有*H. pylori*感染的小鼠胃组织用40 g/L甲醛固定, 石蜡切片, 进行Giemsa染色, 并于400倍显微镜下观察5个切片视野, 以*H. pylori*数量多少进行计分判断其定植情况, 评分标准如表1^[10]. 并观察黏膜固有层慢性炎症细胞(淋巴细胞、浆细胞及嗜酸性粒细胞)和中性粒细胞浸润情况, 对固有层慢性炎症程度进行计分, 标准如表2^[11].

1.2.5 血清中NO的含量测定: 取有*H. pylori*感

□ 相关报道

目前大量研究表明, 清热化湿类中药及成方对*H. pylori*有较强的杀灭作用, 且对于胃黏膜修复作用优于单纯三联抗生素疗法. 然而其促进黏膜修复的机制尚不甚清晰, 有待进一步研究以明确.

创新点

本研究首次观察了清热化湿舒胃方联合三联抗生素对*H. pylori*感染实验小鼠胃黏膜内一氧化氮(nitric oxide, NO)及诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)含量的影响, 有助于进一步阐明清热化湿类中药方剂对胃黏膜产生修复作用的机制。

表 1 *H. pylori*定植量的评分标准

| 分数 | 评分标准 |
|----|--|
| 0分 | 任何胃小凹内均观察不到 <i>H. pylori</i> 定植 |
| 1分 | 少量 <i>H. pylori</i> 定植且不是每个胃小凹内都能观察到(1-2个细菌/胃小凹) |
| 2分 | <i>H. pylori</i> 定植量低但在多数胃小凹内可观察到(3-10个细菌/胃小凹) |
| 3分 | 所有胃小凹内均有中量到多量的 <i>H. pylori</i> (11-20个 <i>H. pylori</i> /胃小凹) |
| 4分 | 大量定植, 所有胃小凹内均满布 <i>H. pylori</i> (>20个 <i>H. pylori</i> /胃小凹) |

H. pylori: 幽门螺旋杆菌。

表 2 胃黏膜病理组织学评分标准

| 分数 | 评分标准 |
|----|------------------------|
| 0分 | 未见或偶见炎症细胞 |
| 1分 | 轻度的多灶性分布 |
| 2分 | 轻度的广泛分布或中度的多灶性分布 |
| 3分 | 轻度广泛分布并中度多灶性分布或重度多灶性分布 |
| 4分 | 中度广泛分布 |
| 5分 | 中度广泛分布并重度多灶性分布 |
| 6分 | 重度广泛分布 |

染的各组小鼠血清, 按照NO试剂盒说明书采用硝酸还原酶法检测血清中NO的含量。

1.2.6 胃组织中iNOS的表达量测定: 取有*H. pylori*感染的各组小鼠的另一部分胃组织放入4%多聚甲醛/PBS中固定24 h后, 脱水、透明、石蜡包埋, 进行免疫组织化学染色。具体操作为制作5 μm石蜡切片, 贴敷于玻璃载片上, 用3% H_2O_2 去离子水孵育10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; 蒸馏水冲洗后以PBS浸泡5 min, 滴加正常血清孵育15 min, 倾去, 不洗涤。滴加1:100的一抗(兔抗鼠多克隆抗体), 37℃孵育2 h, PBS冲洗3次×3 min; 滴加二抗(IgG), 室温孵育1 h, PBS冲洗3次×3 min; 滴加SP, 室温孵育1 h, PBS冲洗3次×3 min; 显色剂DAB- H_2O_2 显色; 自来水冲洗, 脱水、透明、封片。同时以PBS代替第一抗体, 作阴性对照试验。反应切片用Olympus显微镜进行形态学观察, 然后用HMIAS-2000高清晰度彩色医学图文分析系统分析, 每组切片在400倍物镜下随机取5个视野, 经灰度调节后, 测定阳性细胞平均光密度。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行数据处理和分析, 计量资料数据以mean±SD表示。若数据符合正态分布, 方差齐性, 多组数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比

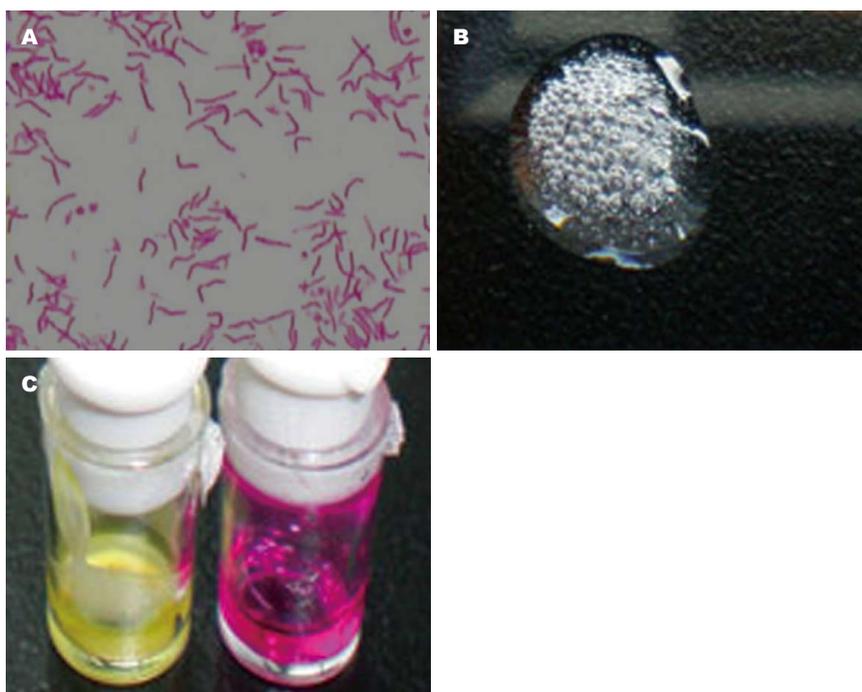
较采用LSD进行分析, 自身的前后对照采用配对*t*检验; 若数据不符合正态分布或方差不齐, 则采用非参数检验中的多个独立样本Kruskal-Wallis *H*检验, 两两比较采用SNK-*q*进行分析。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *H. pylori*培养情况 革兰氏染色后显微镜下可见*H. pylori*呈典型的螺旋状或S状弯曲, 偶见杆状或圆球状, 菌体一端或两端有多根带鞘鞭毛, 染色呈阴性, 运动活泼(图1); 快速尿素酶试验可见与细菌尿素酶比色定性检测试剂接触部分在2 min左右变成紫红色, 而空白培养基无颜色改变; 过氧化氢酶试验发现与过氧化氢接触部位出现大量的气泡, 呈阳性。

2.2 *H. pylori*定植的判断及胃黏膜慢性炎症评分结果 经革兰染色涂片镜检、尿素酶试验和过氧化氢酶试验, 发现有*H. pylori*感染的MG组小鼠12只, CG小鼠11只, CTG组小鼠10只, TG组小鼠10只, 其余9只小鼠未见明显的*H. pylori*感染。对各组小鼠进行*H. pylori*定植判断结果如表3。

由结果可见, 与模型组比较, 清热化湿舒胃方组、三联抗生素组和联合用药组*H. pylori*定植评分显著下降(*P*<0.05), 表明经上述3种干



应用要点
 清热化湿舒胃方联合三联抗生素根除*H. pylori*感染疗效确切。通过对比发现清热化湿舒胃方可进一步降低胃黏膜中NO及iNOS含量, 促进胃黏膜修复。对比单纯三联抗生素治疗不良反应少, 疗效更佳, 有较大的临床应用前景。

图 1 *H. pylori*的显微鉴别和生化鉴别结果. A: 显微观察(×200); B: 过氧化氢酶试验结果; C: 快速尿素酶试验. *H. pylori*: 幽门螺旋杆菌.

表 3 *H. pylori*定植的判断及胃黏膜慢性炎症评分结果 (mean ± SD, 分)

| 分组 | n | <i>H. pylori</i> 定植评分 | 胃黏膜慢性炎症评分 |
|-----------|----|------------------------------|-------------------------------|
| 正常组 | 12 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 模型组 | 10 | 3.600 ± 0.241 ^a | 4.000 ± 0.330 ^a |
| 清热化湿舒胃方组 | 11 | 2.927 ± 0.326 ^{ac} | 2.109 ± 0.274 ^{ac} |
| 三联抗生素组 | 10 | 1.800 ± 0.313 ^{ace} | 2.820 ± 0.274 ^{ace} |
| 复方+三联抗生素组 | 10 | 1.660 ± 0.411 ^{ace} | 1.580 ± 0.371 ^{aceg} |

^a*P*<0.05 vs 正常组; ^b*P*<0.05 vs 模型组; ^c*P*<0.05 vs 清热化湿舒胃方组; ^d*P*<0.05 vs 三联抗生素组. *H. pylori*: 幽门螺旋杆菌.

预处理后, 小鼠胃组织中*H. pylori*显著减少, 且三联抗生素组对*H. pylori*的根除效率显著高于清热化湿舒胃方组(*P*<0.05), 而三联抗生素组与联合用药组差异无统计学意义. 由结果可见, 与模型组比较, 清热化湿舒胃方组、三联抗生素组和联合用药组胃黏膜慢性炎症评分显著下降(*P*<0.05), 且清热化湿舒胃方组的效果显著高于三联抗生素组(*P*<0.05), 两者联用可显著增强其对胃黏膜慢性炎症的修复作用. 结果提示, 清热化湿舒胃方与三联抗生素联用对*H. pylori*感染所致的慢性胃炎的疗效最佳, 其主要机制可能与三联抗生素主要发挥根除*H. pylori*的作用, 而清热化湿舒胃方主要发挥修复胃黏膜炎症的作用有关.

2.3 血清中NO含量测定和iNOS表达量的测定
 与正常组比较, 有*H. pylori*感染的模型小鼠胃组织中NO含量显著升高(*P*<0.05); 与模型组比较, 各给药组小鼠胃组织中NO含量均显著下降(*P*<0.05), 且三联抗生素组小鼠胃组织中NO含量显著高于清热化湿舒胃方组和联合用药组(*P*<0.05, *P*<0.05), 但清热化湿舒胃方组和联合用药组差异无统计学意义(*P*>0.05)(表 4). 与正常组比较, 有*H. pylori*感染的模型小鼠胃组织中iNOS的表达量显著升高(*P*<0.05); 与模型组比较, 清热化湿舒胃方组和联合用药组小鼠胃组织中iNOS表达量均显著下降(*P*<0.05), 但三联抗生素组差异无统计学意义(*P*>0.05); 小鼠胃组织中iNOS的表达量在清热

名词解释

NO: 是由胃黏膜血管内皮细胞和神经细胞中的iNOS作用于L-精氨酸而产生的。NO具有调节胃黏膜血流量、胃酸分泌和黏液分泌, 保护胃黏膜的作用。炎症刺激可诱导iNOS表达增强, 产生大量的NO与超氧阴离子与过氧化氢等结合从而介导组织细胞脂质过氧化和细胞毒作用, 可杀伤病菌、肿瘤细胞及有机异物等引发炎症。

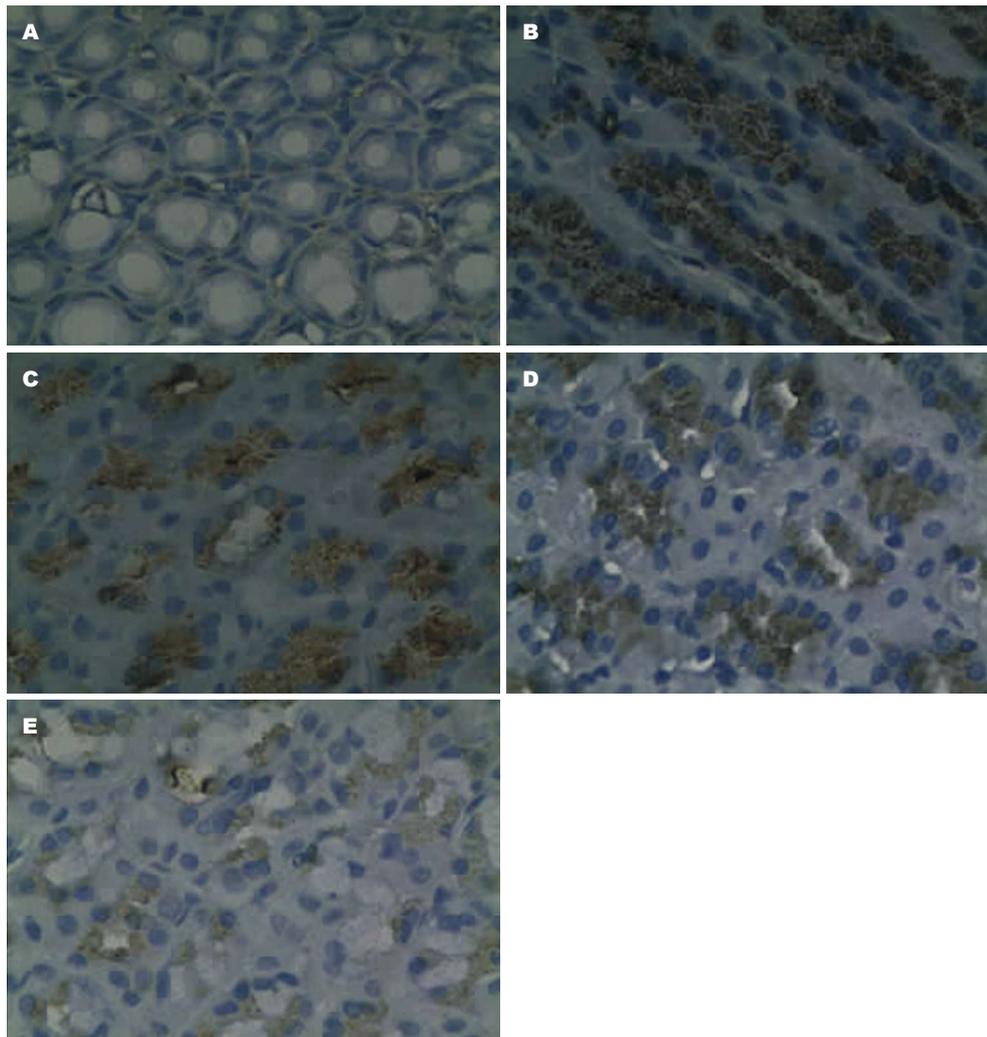


图 2 各组小鼠胃组织中iNOS的表达情况(×400)。A: 正常组; B: 模型组; C: 清热化湿舒胃方组; D: 三联抗生素组; E: 清热化湿舒胃方+三联抗生素组。iNOS: 诱导性一氧化氮合酶。

表 4 血清中NO含量测定和iNOS表达量的测定结果

| 分组 | n | NO含量(ng/mL) | iNOS表达量 |
|-----------|----|---------------------------------|--------------------------------|
| 正常组 | 12 | 16.4927 ± 1.5462 | 0.2484 ± 0.0476 |
| 模型组 | 10 | 51.4399 ± 3.0782 ^a | 0.6211 ± 0.0468 ^a |
| 清热化湿舒胃方组 | 11 | 29.9099 ± 3.4624 ^{ac} | 0.5031 ± 0.0538 ^{ac} |
| 三联抗生素组 | 10 | 39.8423 ± 3.8914 ^{ac} | 0.5844 ± 0.0339 ^{ac} |
| 复方+三联抗生素组 | 10 | 26.5944 ± 1.9648 ^{acg} | 0.4950 ± 0.0555 ^{acg} |

^aP<0.05 vs 正常组; ^bP<0.05 vs 模型组; ^cP<0.05 vs 清热化湿舒胃方组; ^gP<0.05 vs 三联抗生素组。NO: 一氧化氮; iNOS: 诱导性一氧化氮合酶。

化湿舒胃方组和联合用药组差异无统计学意义(P>0.05)(表4, 图2)。

3 讨论

调查研究^[12]表明, *H. pylori*在全世界范围感染率超过50%, 我国平均感染率为55%。目前大

量的研究^[13,14]证实*H. pylori*与慢性胃炎、胃溃疡、胃癌的发生、发展有密切关系, 是极其重要的始动因素。临床上多采用两种抗生素加质子泵抑制剂作为根除*H. pylori*的首选药物。但近年来, 随着抗生素的广泛使用及不规范的治疗, 抗生素的耐药性逐年升高, 三联疗法清除

率已经普遍下降. 且该法存在患者依从性差、不良反应大和抗生素耐药等缺点^[15]. 现今推荐抗生素四联疗法清除*H. pylori*的方案存在重金属累积残留的隐患. 而中药复方具有相对安全, 不良反应小, 耐药性少, 不会引起肠道菌群失调等优势, 已被最新的*H. pylori*清除共识意见所推荐^[9], 成为辅助根除*H. pylori*的研究热点^[16,17].

本研究采用的建模方法成功地建立了小鼠胃感染*H. pylori*模型, 方法简便, 效果稳定, 可用于抗*H. pylori*药物的实验研究. 研究表明, 采用清热化湿舒胃方联合三联抗生素有明显的根除*H. pylori*作用, 其作用可能与修复胃黏膜慢性炎症有关, 疗效比三联抗生素效果佳.

在*H. pylori*感染引起慢性胃炎、消化性溃疡的过程中, NO具有重要的作用. 正常情况下, 胃黏膜血管内皮细胞和神经细胞中的iNOS作用于L-精氨酸, 产生生理需要的NO, 调节胃黏膜血流量、胃酸分泌和黏液分泌, 起到保护胃黏膜的作用. 当胃黏膜发生炎症时, 细菌内毒素及炎细胞分泌和释放大量的细胞因子等诱导iNOS表达增强, 产生大量的NO, 过量的NO可与超氧阴离子与过氧化氢等结合从而介导组织细胞脂质过氧化和细胞毒性作用, 可杀伤入侵的细菌、真菌等微生物和肿瘤细胞、有机异物等^[18-20], 一定程度上具有诱发机体产生炎症和免疫反应的作用, 进而导致胃黏膜的损伤^[21,22]. 有学者运用一氧化氮合酶抑制剂氨基胍(AG)发现可明显降低组织器官等相关损伤与炎症反应^[23,24]. 魏房等^[25]研究发现iNOS有促进肿瘤血管生成而促进胃癌的转移的作用. 本研究发现, 感染*H. pylori*小鼠iNOS的表达和NO含量均较正常组显著增加, 提示iNOS活性增高, NO过量释放是*H. pylori*致慢性炎症、消化性溃疡的机制之一. 而以清热化湿舒胃方及清热化湿舒胃方联合三联抗生素治疗后, iNOS表达和NO量均显著降低, 且两者之间差异无统计学意义, 提示清热化湿舒胃方能够修复*H. pylori*所致胃黏膜慢性炎症且该修复作用与三联抗生素无关, 其机制可能与调控iNOS的表达及NO的释放有关.

清热化湿舒胃方是广州中医药大学附属广州市中医医院临床使用10余年的中药复方, 对急性慢性胃炎、浅表性胃炎和萎缩性胃炎等有

较好的治疗效果, 主要由姜厚朴、佩兰、蒲公英、广藿香、紫苏梗、枳壳、茯苓、白术、熟地黄、黄芩、甘草等11味药组成. 目前研究^[16,26]表明, 黄芩、蒲公英^[27]已证实对*H. pylori*有较强的杀灭作用; 并有相关研究^[28]提示黄芩可通过下调iNOS基因转录和蛋白表达, 降低LPS诱导的巨噬细胞NO生成, 抑制炎症反应. 王嫦鹤等^[29]研究发现白术内酯I可对抑制NO、iNOS等炎症介质的释放或过强表达, 进而减轻实验小鼠体内免疫反应, 降低组织损伤. 茯苓具有免疫调节作用和较强的抗氧化作用, 能提高动物体内自由基清除酶的活力^[30], 而过量的NO可与超氧阴离子与过氧化氢等结合形成的活性代谢产物是*H. pylori*致病的主要因素之一, 清热化湿舒胃方抗*H. pylori*所致炎症可能与黄芩、白术、茯苓降低组织中NO及iNOS的表达与生成, 进而减轻炎症反应, 起到保护胃黏膜的作用有关. 清热化湿舒胃方既能直接杀灭*H. pylori*, 清除*H. pylori*引起的一些致病因素, 还能调节免疫系统, 增强胃黏膜抵御*H. pylori*的能力, 其根除*H. pylori*效果虽不及西药的三联疗法, 但对胃黏膜慢性炎症的修复作用更佳, 且不存在耐药性、不良反应及致肠道菌群失调等问题, 具有较好的应用前景, 有待进一步开发研究.

□ 同行评价

本研究科学的将清热化湿舒胃方对*H. pylori*感染小鼠体内NO及胃组织iNOS的影响进行了观察与研究. 发现该中药复方不仅有效辅助三联抗生素治疗方案进行*H. pylori*清除, 同时还可显著降低实验鼠体内NO及iNOS的表达, 从而起到减轻胃黏膜炎症反应, 促进修复的作用. 一定程度上揭示了清热化湿类中药复方治疗*H. pylori*相关性胃炎的作用机制, 具有一定的创新性.

4 参考文献

- 1 Repetto O, Zanussi S, Casarotto M, Canzonieri V, De Paoli P, Cannizzaro R, De Re V. Differential proteomics of *Helicobacter pylori* associated with autoimmune atrophic gastritis. *Mol Med* 2014; 20: 57-71 [PMID: 24395566 DOI: 10.2119/molmed.2013.00076]
- 2 Arnold IC, Hitzler I, Müller A. The immunomodulatory properties of *Helicobacter pylori* confer protection against allergic and chronic inflammatory disorders. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 10 [PMID: 22919602 DOI: 10.3389/fcimb.2012.00010]
- 3 谭晓, 蔡光先. 胃溃疡炎症机制及中医药防治进展. *湖南中医药大学学报* 2009; 29: 72-74
- 4 于阳, 赵顺. 幽门螺旋杆菌与慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌的关系探讨. *中国实用医药* 2013; 8: 65-66
- 5 Cherdantseva LA, Potapova OV, Sharkova TV, Belyaeva YY, Shkurupiy VA. Association of *Helicobacter pylori* and iNOS production by macrophages and lymphocytes in the gastric mucosa in chronic gastritis. *J Immunol Res* 2014; 2014: 762514 [PMID: 25309933 DOI: 10.1155/2014/762514]
- 6 王丽, 周源, 姜德建, 李元建. 一氧化氮合酶抑制物在胃黏膜损伤中的作用与机制. *国际病理科学与临床杂志* 2006; 26: 1-6
- 7 伍参荣, 彭程, 郭春秀, 蔡锐, 白宇乾, 唐小枚. 戊己丸水煎液对幽门螺旋杆菌感染小鼠体内NO含量的

- 影响. 中医药导报 2006; 12: 65-66, 73
- 8 陈芳. 清热化湿法联合西药治疗HP相关性胃炎临床疗效观察. 广州: 广州中医药大学, 2013
- 9 刘文忠, 谢勇, 成虹, 吕农华, 胡伏莲, 张万岱, 周丽雅, 陈焯, 曾志荣, 王崇文, 萧树东, 潘国宗, 胡品津. 第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告. 现代消化及介入诊疗 2012; 17: 358-363
- 10 张维森, 张永宏, 许春杏, 陈峥宏, 杨杰, 谢国文. C57BL/6小鼠幽门螺杆菌感染胃炎模型的复制. 贵州医药 2013; 37: 105-109
- 11 刘翔. 胃内菌群对H. pylori定植的影响和双歧杆菌治疗. 长沙: 中南大学, 2007
- 12 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染相关疾病. 中国医刊 2007; 42: 17-18
- 13 樊慧丽, 陈玉梅. 幽门螺杆菌感染及其相关疾病发病机制的研究进展. 中国全科医学 2011; 14: 577-579
- 14 Wang YZ, Cao YQ, Wu JN, Chen M, Cha XY. Expression of nitric oxide synthase in human gastric carcinoma and its relation to p53, PCNA. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 46-50 [PMID: 15609395 DOI: 10.3748/wjg.v11.i1.46]
- 15 李莉, 冯怀志, 李硕, 卢海波, 李鹏, 孙慧. 胃炎口服液治疗幽门螺杆菌感染小鼠的实验研究. 泸州医学院学报 2014; 37: 357-359
- 16 李瀚旻, 严永祥, 程思思. 幽门螺杆菌的中医治疗与进展. 中华中医药学刊 2014; 32: 2055-2057
- 17 周宁, 吴琼, 孙健, 李琦. 中医药防治幽门螺杆菌相关性胃病的研究进展. 中国实验方剂学杂志 2012; 18: 229-233
- 18 郭昱, 郭霞, 姚希贤. Hp对慢性萎缩性胃炎内皮素及一氧化氮水平影响的实验与临床研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 562-564
- 19 朱启槐, 吴建波, 谭映霞. HP与胃黏膜组织中iNOS-mRNA表达水平的相关性. 浙江中西医结合杂志 2004; 14: 93-95
- 20 雷琳, 黄亚平, 龚文容. 不同胃黏膜病变中iNOS表达与Hp的关系. 现代肿瘤医学 2013; 21: 1558-1561
- 21 Hsu DZ, Liu MY. Involvement of nitric oxide in gastric protection of epinephrine in endotoxin intoxication in rats. *Toxicology* 2004; 204: 203-208 [PMID: 15388246 DOI: 10.1016/j.tox.2004.06.059]
- 22 Raji L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006; 8: 30-39 [PMID: 17170604 DOI: 10.1111/j.1524-6175.2006.06025.x]
- 23 李柏峰, 刘永锋, 夏丽萍, 程颖, 成东华, 王晓东, 李铁民, 赵宁. iNOS抑制剂对大鼠胰腺缺血/再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 44-48
- 24 王凝, 展玉涛, 高福生, 刘宾. 选择性iNOS抑制剂对肝硬化大鼠门脉高压性胃黏膜病变的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 813-816
- 25 魏房, 孙威, 王强, 刘丽, 任庆华. HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3900-3903
- 26 吴明慧, 黄衍强, 黄赞松, 周喜汉, 喻文强, 苏建伟. 黄连素、大黄素、五味子及黄芩苷对幽门螺杆菌多重耐药株的体外抑菌作用. 世界华人消化杂志 2013; 21: 3247-3251
- 27 胡伟, 王红, 程丽, 周曾芬, 李晓燕, 段丽萍, 陈娅蓉, 蒋海燕, 贾友兰. 蒲公英对幽门螺杆菌体外抑菌作用的实验研究. 胃肠病学 2006; 11: 365-366
- 28 李岩, 邝枣园, 李明, 王宏敏, 陈伟强. 黄芩苷对脂多糖诱导巨噬细胞一氧化氮和一氧化氮合酶表达的影响. 广东医学 2010; 31: 675-677
- 29 王嫦鹤, 耿庆光, 王雨轩. 白术内酯 对免疫性肝损伤的保护作用. 中国中药杂志 2012; 37: 1809-1813
- 30 曹颖. 茯苓多糖药理作用的研究. 中国现代药物应用 2013; 7: 217-218

编辑: 韦元涛 电编: 都珍珠

