

健脾清热化瘀中药对胃溃疡愈合质量影响的实验研究

吕冠华¹, 包永欣^{2*}, 李海泉¹, 赵金婷¹

(1. 辽宁中医药大学附属第二医院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 解放军第四六三医院, 辽宁 沈阳 110042)

[摘要] **目的:** 探讨健脾清热化瘀中药对大鼠乙酸性胃溃疡愈合质量的影响。**方法:** 采用冰醋酸注射法制备大鼠胃溃疡模型, 随机分为模型组、雷尼替丁组(西药组)、健脾中药组、清热中药组、化瘀中药组、健脾清热化瘀中药组(合用组)和正常对照组(空白组)。于给药 14 d 后在光镜下观察溃疡指数(UI)、再生黏膜厚度、黏膜肌层缺损宽度及囊状扩张腺体数量, 应用 ELISA 法检测血清表皮生长因子(EGF)及 6-酮-前列腺素 F1 α (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)含量, 免疫组化法检测胃黏膜表皮生长因子受体(EGFR)的表达。**结果:** 健脾、清热、化瘀中药及其合方都能使再生黏膜厚度增加, 黏膜肌层缺损宽度及囊状扩张腺体数量减少, 与模型组比较 $P < 0.01$, 中药合方组疗效明显优于西药组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。健脾清热化瘀中药可明显提高血清 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量, 与模型组比较 $P < 0.01$, 接近空白组水平, 明显高于雷尼替丁组($P < 0.05$)。中药各组及西药组血清 EGF 含量较模型组及空白组升高($P < 0.01$), 且可明显增强胃溃疡黏膜 EGFR 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 尤以中药合方组疗效最为明显($P < 0.01$)。**结论:** 健脾清热化瘀中药通过改善胃溃疡再生黏膜组织学成熟度和功能成熟度, 可明显改善实验性胃溃疡愈合质量, 有效减少复发。

[关键词] 健脾清热化瘀药; 胃溃疡; 溃疡愈合质量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)11-0063-04

Effect of Drugs of Invigorating Spleen, Heat-clearing and Eliminating Stasis on QOUH in the Rat Model of Gastric Ulcer

LV Guan-hua¹, BAO Yong-xin^{2*}, LI Hai-quan¹, ZHAO Jin-ting¹

(The Second Affiliated Hospital, Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of drugs of invigorating spleen, heat-clearing, eliminating stasis on QOUH in rat model of gastric ulcer. **Methods:** The rat model of gastric ulcer was constructed by injection of acetic acid. The rats were randomly divided into model group, ranitidine group, invigorating spleen group, heating-clearing group, eliminating stasis group, complex prescription group and normal control group. The ulcer index(UI), regenerated mucosal thickness, lamina muscularis mucosal width and capsular broaden glandular organ quantity were observed by HE, and the levels of EGF and 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ were detected by ELISA. The expression of EGFR in the mucosa around the ulcer was detected by SABC kit immunohistochemical method. **Results:** Compared with Model group, the regenerated mucosal thickness, lamina muscularis mucosae defect extent, UI and capsular broaden glandular organ quantity in invigorating spleen, heat-clearing, eliminating stasis and complex prescription treating groups were different significantly($P < 0.01$). And the effect of complex prescription was better than ranitidine in different degree($P < 0.05$, or $P < 0.01$). Compared

[收稿日期] 2009-03-09

[基金项目] 辽宁省教育厅资助项目(2004F128)

[通讯作者] * 包永欣, Tel: 13322445565; E-mail: baodoctor@tom.com

with ranitidine, invigorating spleen group, heating-clearing group, eliminating stasis increased the levels of 6-keto-PGF_{1α} closed to the normal. Compared with model group and normal control group, the levels of EGF in serum in treating groups were increased significantly ($P < 0.01$). Positive expression of EGFR around ulcerative tissues in treating groups were strengthened obviously ($P < 0.05$, or $P < 0.01$), and the effect of complex prescription was the best ($P < 0.01$).

Conclusion: Drugs of invigorating spleen, heat-clearing and eliminating stasis can improve the QOUH and prevent from recurring by improving histological maturation and functional maturation of regenerative mucosa in GU rats.

[Key words] drugs of invigorating spleen, heat-clearing and eliminating stasis; gastric ulcer; QOUH

胃溃疡是临床常见病、多发病,目前药物治疗近期愈合较好,但停药后复发率高,因此对胃溃疡的治疗应重视提高远期疗效,防治复发。胃溃疡属中医“胃脘痛”的范畴,以脾胃虚弱、热毒内结、气滞血瘀为主要病机。研究资料证实^[1-2],健脾清热化瘀中药不仅能消除溃疡病的损害因素,增强胃黏膜保护因素,而且在治愈溃疡病的同时,还能对紊乱的消化功能进行调整,提高愈合质量从而降低其复发率。本研究应用溃疡愈合质量(QOUH)的评价标准,从组织学成熟度和功能成熟度两方面对溃疡再生黏膜愈合质量进行客观评价,探讨健脾清热化瘀中药提高 QOUH 和减少溃疡复发的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 SD 雄性大鼠,体重 200~220 g,共 70 只,由沈阳军区总医院实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(军)2007-001。

1.1.2 药物 健脾中药:黄芪 20 g,党参 15 g,甘草 5 g;清热中药:蒲公英 15 g,地丁 15 g,黄连 5 g,半枝莲 15 g;化瘀中药:当归 10 g,丹参 15 g,莪术 15 g,元胡 10 g。中药配方颗粒购自广东一方制药有限公司。雷尼替丁胶囊由杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司生产,国药准字 H33021741,批号:1059,150 mg/粒。

1.1.3 仪器与试剂 表皮生长因子(EGF)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供;表皮生长因子受体(EGFR)多克隆抗体及即用型 SABC 免疫组化试剂盒由北京中杉生物工程有限公司提供。图像分析采用 MPIAS 多媒体彩色病理图纹分析系统。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 应用冰乙酸浆膜下注射法制备大鼠胃溃疡模型^[3],造模前禁食不禁水 24 h,2% 速麻安 2 号注射液 10 mL·kg⁻¹ ip 麻醉后,将大鼠仰卧

位固定,开腹,在胃窦前壁胃壁肌层与浆膜层之间注入 100% 冰乙酸 0.03 mL,然后覆盖网膜,间断缝合腹膜、腹壁各层组织和皮肤。

1.2.2 分组及给药 70 只大鼠随机分为 7 组,即空白组、模型组、雷尼替丁组(西药组)、健脾中药组、清热中药组、化瘀中药组和健脾清热化瘀中药组(合用组),每组 10 只。除空白组外,其余 6 组造模 3 d 后开始给药,用药剂量按人与大鼠体表面积换算,如表中所示。空白组与模型组给予 0.9% 生理盐水。各组均按 10 mL·kg⁻¹ ig,1 次/d,共 14 d。

1.2.3 标本采集与处理 末次给药后,大鼠禁食 24 h 后麻醉,于腹主动脉采血 4 mL,在室温下静置后离心(2 500 r·min⁻¹,10 min),取血清,-20℃ 保存备用。开腹,分别结扎贲门、幽门后取出胃,沿胃大弯剪开,冰生理盐水冲洗,测量溃疡长径和短径,以溃疡平行于胃长轴方向的最长径为中心取材,常规固定制片。

1.2.4 观察指标与检测方法 ①溃疡指数(UI)测定,采用游标卡尺(精确度 0.02 mm)测量溃疡面的最大长径和最大宽径,以二者的乘积作为溃疡指数。

②再生黏膜厚度与黏膜肌层缺损宽度:参照杨雪松^[4]方法,在 HE 染色的切片上,用低倍镜(×10)找到溃疡部位,在高倍镜下(×40)用显微微尺进行测量,观察 5 个视野,计算平均值。③囊状扩张腺体数量:观察再生黏膜内呈囊状扩张的腺体数量(×40)。

④血清 EGF、6-keto-PGF_{1α} 含量测定采用 ELISA 法,按试剂盒说明书步骤操作。⑤黏膜 EGFR 蛋白表达采用免疫组织化学方法,严格按试剂盒说明书步骤操作。应用 MPIAS 多媒体彩色病理图纹分析系统对每张切片随机选取 5 个视野进行图像分析,即采用面积百分比、积分光密度来检测 EGFR 的表达。细胞膜或细胞浆出现棕黄色颗粒为 EGFR 阳性细胞。

1.2.5 统计学分析 试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学分析采用 SPSS11.5 统计软件,组间比较用方差

表 1 各组溃疡指数、再生黏膜厚度、黏膜肌层缺损宽度及囊状腺体扩张数量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	溃疡指数 (mm^2)	再生黏膜厚度 (μm)	黏膜肌层缺损宽度 (μm)	囊状扩张腺体 (个)
模型组	—	21.20 $\pm$ 6.23	221.20 $\pm$ 6.23	233.84 $\pm$ 53.61	6.07 $\pm$ 1.56
西药组	2.7 $\times 10^{-2}$	8.93 $\pm$ 3.20 ²⁾	289.93 $\pm$ 43.51 ²⁾	195.87 $\pm$ 52.59	3.29 $\pm$ 1.04 ²⁾
健脾中药组	3.6	10.76 $\pm$ 3.93 ²⁾	292.76 $\pm$ 34.92 ²⁾	160.76 $\pm$ 40.40 ²⁾	3.59 $\pm$ 1.31 ²⁾
清热中药组	4.5	7.13 $\pm$ 2.70 ^{2,5)}	287.13 $\pm$ 36.42 ²⁾	171.13 $\pm$ 40.47 ²⁾	2.38 $\pm$ 0.90 ^{2,5)}
化瘀中药组	3.6	9.73 $\pm$ 2.92 ²⁾	312.73 $\pm$ 31.45 ²⁾	143.73 $\pm$ 47.69 ^{2,3)}	3.25 $\pm$ 0.97 ²⁾
合用中药组	11.7	3.99 $\pm$ 1.92 ^{2,4,6,9)}	320.99 $\pm$ 32.43 ^{2,3,7)}	119.20 $\pm$ 35.61 ^{2,4,5,7)}	1.59 $\pm$ 0.73 ^{2,4,6,9)}

注：与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与西药组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与中药组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$; 与清热中药组比较⁷⁾ $P < 0.05$; 与化瘀中药组比较⁸⁾ $P < 0.05$, ⁹⁾ $P < 0.01$ (下同)

分析。

2 结果

2.1 溃疡指数、再生黏膜厚度、黏膜肌层缺损宽度及囊状腺体扩张数量变化。

2.2 血清 EGF、 $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$ 含量变化

2.3 胃黏膜 EGFR 免疫组化图像分析结果

表 2 各组血清 EGF、 $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$ 含量变化比较
($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$	EGF
空白组	—	1 694.29 $\pm$ 356.57	117.48 $\pm$ 37.78
模型组	—	1 085.99 $\pm$ 261.96	133.20 $\pm$ 45.02
西药组	2.7 $\times 10^{-2}$	1 265.25 $\pm$ 278.01	222.73 $\pm$ 63.85 ²⁾
健脾中药组	3.6	1 545.41 $\pm$ 401.56 ²⁾	273.87 $\pm$ 51.84 ²⁾
清热中药组	4.5	1 621.01 $\pm$ 389.82 ^{2,3)}	331.03 $\pm$ 65.65 ^{2,4,5)}
化瘀中药组	3.6	1 633.77 $\pm$ 457.06 ^{2,3)}	321.26 $\pm$ 86.34 ^{2,4)}
合用中药组	11.7	1 670.00 $\pm$ 375.61 ^{2,3)}	328.49 $\pm$ 57.96 ^{2,4,5)}

表 3 各组胃黏膜 EGFR 免疫组化图像分析结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	积分光密度	面积百分比(%)
空白组	—	1.11 $\pm$ 0.63	4.61 $\pm$ 3.09
模型组	—	1.49 $\pm$ 0.63	12.89 $\pm$ 4.34
西药组	2.7 $\times 10^{-1}$	2.17 $\pm$ 0.72	18.27 $\pm$ 6.33
健脾中药组	3.6	2.39 $\pm$ 0.99 ¹⁾	19.53 $\pm$ 6.59
清热中药组	4.5	2.32 $\pm$ 0.89 ¹⁾	23.35 $\pm$ 9.56 ²⁾
化瘀中药组	3.6	2.83 $\pm$ 0.83 ²⁾	24.29 $\pm$ 8.98 ²⁾
合用中药组	11.7	3.05 $\pm$ 0.83 ^{2,3,7)}	31.92 $\pm$ 10.24 ^{2,4,6,7,8)}

3 讨论

Taranwski 等^[5]对实验性愈合溃疡进行组织学和超微结构的分析之后,发现所谓愈合溃疡存在明显的组织学和超微结构的异常,如厚度变薄,腺管明显扩张,腺上皮细胞分化不良和(或)变性改变,结缔组织增生,血管排列紊乱等。推测这些残留的异常,会干扰黏膜的防御功能,并可能是溃疡复发的基础,于是他们提出了 QOUH 的概念,包括结构成熟度和功能成熟度,认为溃疡愈合不仅需要缺失组织的再上皮化修复,更需要上皮组织结构的修复重建。

再生胃黏膜组织学成熟度的评价,主要包括再生黏膜的厚度,黏膜肌层缺损宽度和囊状扩张腺体数量等。再生黏膜功能成熟度的评价,主要包括前列腺素(PGs),表皮生长因子(EGF)等的测定。PGI₂是大鼠胃黏膜组织中含最高的一型前列腺素,能影响胃黏膜血流量并具有胃肠黏膜保护作用,可加速溃疡的愈合^[6]。PGI₂生物半衰期仅 2~3 min,很快变成稳定的 6-酮-前列腺素 F_{1 α} ($\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$),因此检测 $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的含量能反映出 PGI₂ 的水平^[7]。溃疡的愈合与胃黏膜 EGF 及其受体的表达亦有密切关系,EGF 是一种在细胞增殖和分化中起重要作用的分子^[8],具有抑制胃酸分泌,增加胃黏膜血流量,增加黏膜细胞的 DNA、RNA 及蛋白质的合成,促进胃黏膜上皮细胞增殖,又能促进表面上皮细胞透明质酸酶的合成、成纤维细胞生长以及胶原产生的作用。Konturek 等^[9]实验证明,乙酸诱导产生的胃溃疡,其愈合过程伴有明显的 EGF 表达。EGF 表达增强可以促进溃疡边缘增生。而 EGF 要发挥作用,必须与相应的受体结合。EGFR 具有促进胃肠黏膜增殖、发育及修复,减少胃酸分泌等重要功能。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,调节细胞生长与分化。Tarnawski 等^[10]观测发现当胃黏膜受损或溃疡形成后,损伤组织边缘黏膜 EGF 及受体表达增加,在两者的调控下,黏膜上皮成分发生变化,上皮细胞失去分化能力,发生增殖,移行到肉芽组织表面,从而覆盖溃疡底部,促进溃疡愈合。

胃溃疡的病机多虚实夹杂和寒热错杂,脾胃虚弱是胃溃疡发病和复发的根本因素,瘀热是其发病的重要病理环节。健脾清热化瘀中药治疗胃溃疡是沈阳军区总医院王长洪主任医师多年临床实践总结出来的治疗方案,临床疗效确切,具有迅速缓解症状,明显减少复发的特点。临证时应用黄芪、党参、甘草益气健脾扶正以治本,蒲公英、地丁、黄连、半枝莲清热以祛邪,当归、丹参、莪术、元胡活血止痛,去瘀生新,诸药合用共奏扶正祛邪标本兼顾之效。本研究从治法与药物入手,探讨健脾清热化瘀药物对实验性胃溃疡愈合质量的影响,结果表明:健脾、清热、化瘀药物及其合方都能使再生黏膜厚度增加,溃疡指数、黏膜肌层缺损宽度及囊状扩张腺体数量明显减少,与模型组比较有非常显著性差异($P < 0.01$),中药合方治疗组疗效明显优于雷尼替丁治疗组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明健脾、清热、化瘀中药有促进上皮组织再生和改善瘢痕修复能力,提高再生黏膜结构成熟度的作用。生理水平 PGI₂ 具有细胞保护作用。本实验中模型组 6-keto-PGF_{1α} 水平较对照组明显下降($P < 0.01$)也证明了胃黏膜损伤后其保护机制受到破坏。健脾清热化瘀中药组均能明显提高血清 6-keto-PGF_{1α} 含量,接近于空白对照组水平($P > 0.05$),明显高于模型组和雷尼替丁治疗组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明健脾清热化瘀中药可促进胃黏膜合成 6-keto-PGF_{1α},从而加速胃黏膜上皮细胞的修复。中药各组及雷尼替丁组血清 EGF 含量较溃疡模型组及空白组升高($P < 0.01$),说明雷尼替丁与健脾清热化瘀药均能通过刺激 EGF 分泌,产生促进上皮增殖、维护组织修复和细胞保护的作用。

健脾清热化瘀中药可明显增强胃溃疡边缘上皮细胞 EGFR 的表达($P < 0.01$),表明胃黏膜上皮细胞是 EGF 的靶细胞,EGFR 是溃疡病组织修复过程中的主要环节。本研究结果显示,健脾清热化瘀中药通过改善胃溃疡再生黏膜组织学成熟度和功能成熟度,可明显改善实验性胃溃疡愈合质量,有效减少复发。

[参考文献]

- [1] 周福生,胡丽娟,黄绍刚,等.健脾清热化瘀方抗胃溃疡及复发临床疗效分析[J].北京中医药大学学报,2006,29(10):717-720.
- [2] 周福生,胡丽娟,王汝俊,等.健脾清热化瘀方对胃溃疡患者 T 细胞亚群及 IL-8 的影响[J].上海中医药大学学报,2006,20(2):18-20.
- [3] 王英.冰乙酸性大鼠胃溃疡模型制作方法比较[J].实用诊断与治疗杂志,2007,21(7):505-506.
- [4] 杨雪松,李益农,叶嗣懋,等.大鼠胃溃疡愈合质量与抗强的松再损伤关系的实验研究[J].北京医科大学学报,1996,28(6):454-456.
- [5] Tarnawski A, Stachural J, Williamj K, et al. Quality of gastric ulcer healing: a new, emerging concept. [J] Clin Gastroenterol, 1991, 13(suppl 1): 42-43.
- [6] 高文信,陈英新,聂俊秀,等.复发性口腔溃疡患者血浆血栓素 B2、6-酮前列腺素 F1α 含量测定[J].中华口腔医学杂志,1993,28(2):109-110.
- [7] Synnerstad I, Holm L. Prostaglandin E2 and aggressive factors increase the gland luminal pressure in the rat gastric mucosa in vivo[J]. Gastroenterology, 1998, 114(6): 1276-1286.
- [8] 贺建华.生长因子在消化性溃疡愈合中的作用[J].国外医学:消化系统疾病分册,2003,23(1):12-15.
- [9] Konturek PC, Brzozowski T, Duda A, et al. Epidermal growth factor and prostaglandin E(2) accelerate mucosal recovery from stress-induced gastric lesions via inhibition of apoptosis[J]. J Physiol Paris, 2001, 95(1-6): 361-367.
- [10] Tarnawski AS, Jone MK. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways[J]. J Clin Gastroenterol, 1998, 27(suppl 1): S12-20.