

五味子对冰乙酸性胃溃疡寒、热证大鼠模型 IL-8、VEGF 水平的影响

胡国洪¹ 舒 晴¹ 聂红海² 徐海英³

(1 广州中医药大学附属清远医院/清远中医院病理科, 广州, 511500; 2 广州中医药大学附属清远医院/清远市中医院肛肠普外科, 广州, 511500; 3 广州中医药大学附属清远医院/清远市中医院病案统计室, 广州, 511500)

摘要 目的:探讨五味子对冰乙酸性胃溃疡寒、热证大鼠模型白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8)、血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)表达水平的影响。方法:采用寒、热因素结合冰乙酸涂抹法建立大鼠胃溃疡寒、热证模型,通过 HE 染色观察组织病理改变,联合采用酶联免疫法、RT-PCR、免疫组化方法检测受试大鼠血清 IL-8、VEGF 的含量变化。结果:五味子能够缩小冰乙酸胃溃疡寒热证模型的溃疡面积;冰乙酸涂抹型胃溃疡模型组血清及组织内的 IL-8、VEGF 含量显著升高,与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。五味子可显著升高热证组、寒证组中 VEGF 的表达($P < 0.01$),同时下调热证组、寒证组中 IL-8 的表达($P < 0.05$)。五味子对胃溃疡面积的缩小作用与对 IL-8 及 VEGF 的调节作用呈显著相关性。结论:五味子能够改善冰乙酸性胃溃疡寒、热证大鼠模型胃溃疡黏膜面积,可能通过下调 IL-8 的表达,同时促进 VEGF 的表达有关。

关键词 五味子;胃溃疡;冰乙酸涂抹;寒热证;IL-8;VEGF

The Impact of Schisandra Chinensis on the Expression of IL-8 and VEGF in Gastric Ulcer Rat Model Induced by Glacial Acetic Acid Combined with Cold or Heat Syndrome

Hu Guohong¹, Shu Ching¹, Nie Honghai², Xu Haiying³

(1 Department of Pathology, Qingyuan Hospital/Qingyuan Hospital of traditional Chinese medicine, Guangzhou 511500, China;

2 Anorectal Department of general surgery, Qingyuan Hospital/Qingyuan Hospital of traditional Chinese medicine,

Guangzhou 511500, China; 3 Department of Medical records, Qingyuan Hospital/Qingyuan Hospital

of traditional Chinese medicine, Guangzhou 511500, China)

Abstract Objective: To explore the impact of schisandra chinensis on the expression of IL-8 and VEGF in gastric Ulcer rats model induced by glacial acetic acid combined with cold or heat syndrome. **Methods:** Exposing the rats in cold or heat environment and applying glacial acetic acid to skin to establish gastric ulcer model combined with cold and heat syndrome. Using HE stain to observe the pathologic changes, using ELISA, RT-PCR as well as Immunohistochemistry to detect the contents of IL-8 or VEGF both in serum and in stomach. **Results:** Schisandra chinensis diminishes the area of ulcer. Compared with the blank group, the contents of both IL-8 and VEGF increased remarkably in each ulcer model group without schisandra chinensis. ($P < 0.01$). Schisandra chinensis can up-regulate the expression of VEGF while down-regulate the expression of IL-8 in both serum and stomach of heat-ulcer group or cold-ulcer group obviously ($P < 0.05$). **Conclusion:** The therapeutic action of Schisandra chinensis on heat-gastric ulcer or cold-gastric ulcer can be achieved by up-regulating the expression of VEGF while down-regulating the expression of IL-8 in both serum and stomach.

Key Words Schisandra chinensis; Gastric ulcer; Mearing glacial acetic acid; Cold or heat syndrome; IL-8; VEGF

中图分类号: R573.1; R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.07.023

胃溃疡是临床常见的消化系统疾病,具有反复发作的特点,胃溃疡的发生主要是胃黏膜的损害因素与自身防御修复因素之间的失衡有关^[1],受到多种因子及其受体的调控。五味子是一种具有辛、甘、酸、苦、咸五种药性的果实,五味俱全、五行相生,能对人体五脏的心、肝、脾、肺、肾发挥平衡作用,兼具精、气、神三大补益的药材^[2]。大量研究表明,具有五种药性的五味子能对人体五脏发挥积极作用,为

了深入探讨五味子对于消化系统的平衡作用,了解中医方证相应理论应用于胃溃疡寒热证的治疗功效,本研究通过联合应用 ELISA、PCR、免疫组化方法检测五味子对冰乙酸胃溃疡寒、热证大鼠模型 IL-8、VEGF 表达水平的影响。

1 材料及方法

1.1 实验动物及分组 成年雄性 SD 大鼠 250 ~ 300 g 30 只,购自上海伊莱克斯动物实验中心,随机

分为五组:即正常对照组 6 只,模型组(冰乙酸涂抹模型组)6 只,五假组(五味子+假手术)6 只,五热酸组(五味子+热因素+乙酸涂抹)6 只,五寒酸组(五味子+寒因素+乙酸涂抹)6 只。

1.2 实验用药 热因素:先将辣椒粉过 120 目筛,后溶于 60% 无水乙醇,配制成 8% 干辣椒粉的乙醇混悬液。寒因素:电子天平称取 6 g 氢氧化钠(NaOH),溶于 500 mL 双蒸水配制成 0.3 mol/L 混合液。冰水:冷冻保存,使用时提前取出解冻。五味子药汤:购自西安新通制药有限公司(批号 200806),加 8 倍量沸水浸泡 15 min,过滤;药渣再加入 6 倍量沸水浸泡 15 min,过滤。将两次浸泡药液合并,浓缩成含生药 0.15 g/L,冰箱存储备用。

1.3 试剂 100% 冰乙酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂,20081211);VEGF 试剂盒(美国 RD 公司,20081217);IL-8 试剂盒(美国 RD 公司,20081217);医用酒精(黑龙江华润酒精有限公司,20091207);氢氧化钠(分析纯,天津市大茂化学试剂厂,20090712)

1.4 仪器 恒温培养箱(SANYO,型号 XD-101);酶标仪(BIO-RAD Model,型号 550);低温离心机(科大创新股份有限公司,型号 KDC-40)

1.5 造模方法^[3-4] 胃热模型:按 10 mL/kg 灌服 8% 干辣椒粉的乙醇混悬液,早晚各 1 次,连续 7 d。胃寒模型:按 10 mL/kg 灌服冰水机 0.3 mol/L NaOH 溶液,早晚各 1 次,连续 7 d。冰乙酸涂抹胃溃疡模型:禁食不禁水 24 h,乙醚麻醉后剖腹,拉出全胃于胃底部,用自制胃夹将直接 6 mm 长 2 cm 的塑料管固定于上,然后向管内注入 100% 冰乙酸 0.1 mL,与腺胃部前壁浆膜接触 60 s 后撤去胃夹,用生理盐水清洗局部,然后牵引大网膜包覆,缝合腹壁切口,常规消毒,纱布包扎。假手术:实验时将大鼠用乙醚麻醉,固定于木板上,开腹轻轻拉出全胃,用镊子或其他手术器械刺激腺胃部,将结扎线置于幽门部,但不结扎,缝合腹腔切口,用生理盐水清洗创口并消毒。五味子给药方式:造模术后 24 h 开始灌胃给药,按 100 mg/kg 每日 1 次灌胃。正常对照组、灌胃模型组喂予等容积的生理盐水,连续灌胃 14 d。

1.6 实验取材 末次给药后 24 h,颈动脉取血,分离血清,剖腹取胃,取适量胃组织,部分用于石蜡包埋用于免疫组化,部分生理盐水反复冲洗吸干,称取 0.3~0.4 g 研磨制成 10% 组织匀浆,离心后取上清液,-20 ℃ 冰箱保存,待测。

1.7 HE 染色、免疫组化 标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,切成 4 μm 厚的切片。苏木-伊红法进行

HE 染色。采用免疫组化 SP 法。即用型 UltraSensitive-SP 试剂盒,IL-8 一抗工作浓度 1:100,VEGF 一抗工作浓度 1:500。染色步骤参照说明书进行。二氨基联苯胺(DAB)显色,脱水,透明,封片。磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。溃疡面积的计算:用油标卡尺测量 HE 染片上溃疡的横径和纵径,计算溃疡面积(UA),溃疡面积 = $\frac{1}{4} \times d_1 \times d_2$ (d_1 、 d_2 分别为通过溃疡中心的最大横径和纵径)。免疫组化结果分析:IL-8、VEGF 阳性表达判定以细胞胞浆出现棕黄色颗粒为表达阳性。每张切片在 200 倍光镜下拍 10 个视野,采用 Motic image advanced 6.0 软件对图像进行分析,以灰度值表示阳性细胞着色强度,以阳性着色面积占总面积百分比表示阳性密度。

1.8 ELISA 测定血清 IL-8 及 VEGF 按照试剂盒步骤进行。实验结果用 EXCEL 软件绘制标准曲线,以浓度为横坐标,以 OD 值为纵坐标,根据标准曲线公式,计算浓度。

1.9 RT-PCR 用 RNA TRIzol 试剂盒提取标本的 RNA,按说明书操作。抽提 RNA 经过 DNase (Promega)处理后,反转录酶 PowerScript™ Reverse transcriptase (Clontech)合成 cDNA。cDNA 引物 IL-8:5' ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGC3' (sense) 和 5' ATGACTTCCAAGCTGGCCCGTGGC3' (antisense)^[5]。扩增条件:94 ℃ 变性 1 min;94 ℃ 变性 1 min,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;终止延伸 72 ℃ 5 min。VEGF:5' AAGATCCGCAGACCGTGTAATGTT3' (sense)和 5' CGGCTGTGCACATGCAAGTA3' (antisense)^[6]。扩增条件:94 ℃ 变性 1 min;94 ℃ 变性 40 sec,57 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,40 个循环;终止延伸 72 ℃ 5 min。所得结果用 Motic image advanced 6.0 软件对图像进行灰度分析实现对 IL-8 及 VEGF 的半定量检测。

1.10 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件,数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用单因素方差分析(One-way ANOVA) LSD 或 S-N-K 法进行两两比较检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。采用 Spearman 等级相关分析溃疡面积和 IL-8 或者 VEGF 间的相关程度。

2 结果

2.1 HE 结果显示五味子能够缩小胃溃疡面积 结果见图 1、表 1。

2.2 免疫组化结果及分析 免疫组化结果显示正常对照组及五假组胃组织中仅见极少量的 IL-8 阳性表达,而模型组中的 IL-8 阳性表达明显增多,而五味子灌胃治疗后,寒、热证胃溃疡大鼠胃内 IL-8

的阳性表达均有所减少(见图 2)。免疫组化结果显示正常对照组及五假组胃组织中有少量 VEGF 阳性表达,而模型组中的 VEGF 阳性表达则增多,经过五味子灌胃治疗后,胃溃疡大鼠胃内 VEGF 的阳性表达均更加明显(见图 3)对各组免疫组化结果图按前述的方法进行统计分析,见表 2。

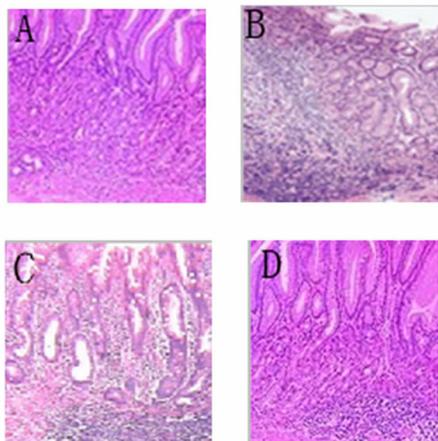


图 1 各组胃部切片 HE 染色比较

注:A 五假组,B 模型组,C 五寒酸组,D 五热酸组。正常对照组及五假组大鼠胃内未见明确溃疡形成(A),模酸组胃组织中可见溃疡形成,胃黏膜结构紊乱,见淋巴细胞浸润(B)。而使用五味子灌胃治疗后,胃内的溃疡面积有所缩小(C,D)

表 1 各组胃溃疡面积的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	溃疡面积(mm ²)
正常对照组	6	
五假组	6	
模型组	6	12.65 ± 1.43
五寒酸组	6	6.73 ± 1.75*
五热酸组	6	6.97 ± 1.38*

注:与模型组比较,*P<0.05。

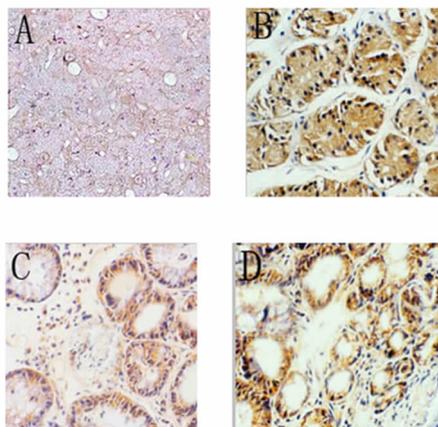


图 2 各组胃部切片 IL-8 免疫组化结果比较

注:A 五假组,B 模型组,C 五寒酸组,D 五热酸组。五假对照组大鼠胃内仅见少量阳性表达(A),模型组中见大量 IL-8 阳性表达(B)。而使用五味子灌胃治疗后,胃内的 IL-8 阳性表达有所减少(C,D)

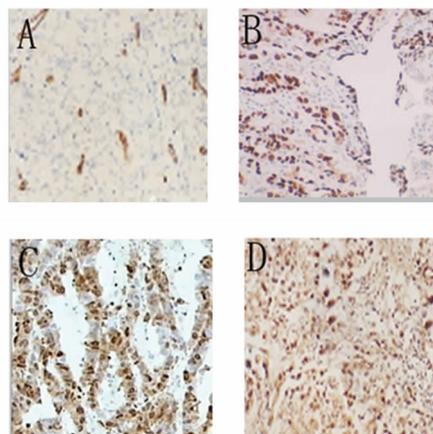


图 3 各组胃部切片 VEGF 免疫组化结果比较

注:A 五假组,B 模型组,C 五寒酸组,D 五热酸组。五假组大鼠胃内可见少量 VEGF 阳性表达(A),模型组中见 VEGF 阳性表达增多(B)。而使用五味子灌胃治疗后,胃内的 VEGF 阳性表达更加明显(C,D)

表 2 各组大鼠 IL-8、VEGF 免疫组化结果分析

组别	例数	IL-8 平均阳性密度	VEGF 平均阳性密度
正常对照组	6	69.98 ± 12.52**	108.21 ± 12.33**
五假组	6	66.72 ± 14.27**	109.95 ± 17.76**
模型组	6	128.79 ± 21.63	139.14 ± 20.64
五寒酸组	6	81.33 ± 18.25*	161.08 ± 23.52**
五热酸组	6	79.69 ± 15.86*	159.81 ± 22.43**

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.3 ELISA 结果 模型组中的 IL-8 表达量显著高于正常组(P<0.01),而五味子能够下调乙酸涂抹胃溃疡寒热证模型的 IL-8 表达(P<0.05)。模型组中 VEGF 的表达水平较正常组升高(P<0.01),而五味子灌胃治疗则进一步促进 VEGF 的表达(P<0.01)。(表 3)

表 3 各组大鼠血清中 IL-8 及 VEGF 表达水平比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$)

组别	例数	IL-8	VEGF
正常对照组	6	28.04 ± 4.32**	98.78 ± 21.72**
五假组	6	29.55 ± 5.18**	102.33 ± 16.28**
模型组	6	59.67 ± 2.98	131.69 ± 20.12
五寒酸组	6	39.65 ± 4.67*	159.45 ± 26.23**
五热酸组	6	38.77 ± 2.91*	155.74 ± 24.62**

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.4 PCR 定量结果 模型组中的 IL-8 mRNA 数显著高于正常组(P<0.01),而五味子治疗能够减少乙酸涂抹胃溃疡寒热证模型的 IL-8mRNA 的表达(P<0.05)。模型组中 VEGF mRNA 的表达量较正常组增高(P<0.01),而五味子灌胃治疗则进一步促进 VEGF 的表达(P<0.01)。见表 4。

2.5 相关性分析 将五味子对胃溃疡的改善作用

与五味子对胃溃疡模型中 IL-8、VEGF 表达水平影响的相关性分析,分别得出 R 值为 0.73 与 0.79,呈现显著相关性。

表 4 各组大鼠血清中 IL-8 及 VEGF RTPCR 结果 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-8 平均灰度值	VEGF 平均灰度值
正常对照组	6	57.87 ± 11.22 **	101.06 ± 11.36 **
五假组	6	59.08 ± 12.40 **	105.21 ± 15.43 **
模型组	6	108.46 ± 17.13	127.72 ± 18.11
五寒酸组	6	69.78 ± 13.05 *	143.59 ± 19.14 **
五热酸组	6	70.07 ± 11.54 *	142.56 ± 18.58 **

注:与模型组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01。

3 讨论

胃溃疡是常见的消化系统疾病,是我国人群中的常见病、多发病之一。引起溃疡的常见病因主要有幽门螺杆菌感染、非甾体抗炎药(如阿司匹林)以及胃酸分泌异常^[7]。研究表明,正常人胃黏膜的防御修复机制,足以平衡胃酸和胃蛋白酶的损伤作用,但当某些致病因素扰乱胃黏膜的平衡后,胃酸和胃蛋白酶侵蚀自身黏膜组织,从而形成胃溃疡^[8]。五味子是一种具有辛、甘、酸、苦、咸五种药性的果实,含有丰富的有机酸、维生素、类黄酮、植物固醇以及有强效复原作用的木酚素,能够抑制胃酸分泌,抑制胃蛋白酶活性,从而减少胃酸和胃蛋白酶对胃黏膜的损伤作用;而从中医学的角度,胃溃疡寒热证致使胃气阴两伤,五味子性温且益气生津,这些均暗示着五味子用于治疗胃溃疡的可行性。此次研究证实了,应用五味子灌胃后,寒热证胃溃疡大鼠模型中的溃疡面积均有不同程度的减小(P < 0.05),说明五味子能够对胃溃疡的形成起到抑制性作用。但是对于五味子的最佳用量、给药方式等还有待进一步探讨。

胃溃疡的一个特点是大量的炎性细胞浸润,这些炎性细胞之间通过释放炎性因子彼此之间构成复杂的炎性网络。IL-8 在胃溃疡的致病机制中起到十分重要的作用,俄而抑制 IL-8 的表达无疑能够对炎性网络的蔓延起到抑制性作用。本次研究通过 ELISA、PCR、免疫组化等多种手段对不同组血清或组织匀浆重的 IL-8 水平进行了检测,发现模型组中 IL-8 的表达对照正常组显著上升,这与之前的多数研究意一致,而通过五味子灌胃治疗,无论是在寒证还是热证胃溃疡胃溃疡模型中,IL-8 的表达均收到抑制,并且相关性研究显示,五味子对胃溃疡面积的缩小作用与其对 IL-8 表达的抑制作用呈现良好的线性相关性,说明五味子对胃溃疡的抑制性作用很

可能是通过其对 IL-8 的表达抑制实现。

VEGF 属于内源性生长因子家族,能够刺激血管内皮细胞的有丝分裂,促进血管的形成,提高血管的通透性^[10]。VEGF 主要由主要由损伤处的角质细胞和巨噬细胞产生,能够保护胃黏膜和通过刺激腺体和血管生成促进溃疡愈合,其受体仅表达于血管内皮细胞表面。血管内皮生长因子在生理和病理条件下均有表达,但在病理条件下表达量增加。这与本次课题的研究结果一致,而通过五味子灌胃后,VEGF 的表达量又进一步上升,VEGF 的表达水平和溃疡处的血管生长情况呈正相关,可用于胃溃疡寒热证治疗效果的评价。五味子对胃溃疡面积的缩小作用与其对 VEGF 表达的促进作用呈现良好的线性相关性,更进一步证实了五味子对胃溃疡的积极疗效。

五味子能够改善冰乙酸性胃溃疡寒、热证大鼠模型胃溃疡黏膜面积,可能通过下调 IL-8 的表达,同时促进 VEGF 的表达有关。此次研究证实了五味子对冰乙酸胃溃疡寒热证的治疗功效。揭示五味子应用于消化系统的临床前景,以及中医方证相应的理论依据。然后,其具体的机制还有待进一步探讨和证实。

参考文献

- [1]王兆彬. 106 例消化性溃疡临床观察[J]. 中国实用医药, 2012, 7(24): 92-93.
- [2]苏桂云, 郭红星. 五味子的炮制与功效[J]. 首都医药, 2012, 19(11): 44.
- [3]才丽平, 蒋宁, 曲怡, 等. 胃粘膜表面局部投予乙酸制备大鼠胃溃疡模型的方法[J]. 解剖科学进展, 2011, 17(1): 8-11, 15.
- [4]李冀, 柴剑波, 李胜智, 等. 寒热方剂对幽门结扎型胃溃疡寒热证模型大鼠炎症因子含量的影响[J]. 陕西中医, 2011, 32(11): 1553-1555.
- [5]Sharma SA, Tummuru MK, Miller gg, et al. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to Helicobacter pylori stimulation in vitro [J]. Infect Immun, 1995, 63(5): 1681.
- [6]李茜, 韩曼丽, 杨学文, 等. 实时荧光定量 PCR 检测大鼠 VEGF mRNA 方法的建立及初步应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010(2): 115-118.
- [7]孟钰. 复方嗜酸乳杆菌联合雷贝拉唑治疗消化性溃疡的疗效观察[J]. 中国医药指南, 2012, 10(18): 610-611.
- [8]潘文, 许丽娜. 消化性溃疡 296 例三、四联疗法对比分析[J]. 陕西医学杂志, 2012, 41(9): 1253-1254.
- [9]Fujiwara Y, Arakawa J, Fukuda T, et al. Interleukin-8 stimulates leukocyte migration across a monolayer of cultured rabbit gastric epithelial cells[J]. Dig Dis Sci, 1997, 42(6): 1210.
- [10]徐晶晶, 黄萍, 吴清和, 等. 胃疡宁丸抗实验性胃溃疡的药效及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 736.