

除幽愈疡免煎颗粒对大鼠实验性胃溃疡表皮生长因子的影响

葛桂萍¹ 杨芳¹ 周国雄²

(1 南通市中医院脾胃科,南通,226000; 2 南通大学,南通,226000)

摘要 目的:研究除幽愈疡免煎颗粒对乙酸致大鼠实验性胃溃疡的愈合效果。方法:将清洁级SD大鼠随即分为5组:A组(正常组/对照组)、B组(模型组)、C组(西药治疗组)、D组(中西医结合组)及E组(纯中药治疗组)。各组均10只,雌雄各半。采用冰乙酸腐蚀法制作胃溃疡大鼠模型。观察除幽愈疡免煎颗粒干预胃溃疡大鼠模型的胃黏膜病理形态学变化,酶联免疫(ELISA)方法检测血清标本 VEGF 含量变化。免疫组化法检测各组大鼠 VEGF 表达,Real-Time PCR 检测各组大鼠 VEGF 表达。结果:同模型组相比,中药、西药和中西药组溃疡面积均显著缩小,差异均有统计学意义($P < 0.05$);同时分别与西药组、中西药组相比,中药组溃疡面积均显著缩小,差异都有统计学意义($P < 0.05$);中药组溃疡抑制率为62.8%,高于中西药组27.1%和西药组34.6%。免疫组织化学结果表明,正常组、中药组和中西医结合组大鼠胃溃疡黏膜有较强的 VEGF 蛋白表达,其余2组 VEGF 蛋白表达较弱;其中,对照组中 VEGF mRNA 表达水平显著高于其他组,而中药组和中西药结合组中 VEGF mRNA 表达水平与对照组相近,明显高于模型组与西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。ELISA 分析发现,中药组血清 VEGF 水平与对照组水平相当,而西药组、中西药结合组中 VEGF 水平低于其他组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:除幽愈疡免煎颗粒可增强胃溃疡大鼠胃组织 VEGF 及 VEGFmRNA 的表达,促进血管新生,促进溃疡愈合。

关键词 除幽愈疡免煎颗粒;胃溃疡;血管内皮生长因子

The effect of Chuyouyuyangmianjian granule on the VEGF of gastric ulcer in rats induced by acetic acid

Ge Guiping¹, Yang Fang¹, Zhou Guoxiong²

(1 Nantong hospital of traditional Chinese medicine department of Gastroenterology, Nantong 226000, China;

2 Nantong university, Nantong 226000, China)

Abstract Objective: To assess the effect of Chuyouyuyangmianjian granule on healing process of acetic-acid-induced gastric ulcer in rats. **Methods:** The rat model of gastric ulcer was constructed by smearing acetic acid method. Specific pathogen-free SD mice were randomly classified into five groups: group A (normal control), group B (acetic-acid-induced gastric ulcer), group C (western medicine treatment), group D (combined therapy of Chinese and Western medicine), group E (western medicine treatment). Each group contained five female and five male rats and was matched by body weight and age. The protein and mRNA expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), in the gastric ulcer tissues or serum were examined by immunohistochemical analysis, ELISA and real-time PCR, respectively. **Results:** The ulcer areas in group C, D, E were significantly reduced compared with that in group B ($P < 0.05$). Notably, the ulcer area in group E was significantly reduced compared with those in group C and group D ($P < 0.05$). The inhibition rate of Chinese medicine was 62.8%, higher than those of combined therapy of Chinese and Western medicine (27.1%) and western medicine treatment (34.6%). The results of immunohistochemical analyses showed that the expression level of VEGF was upregulated in the gastric ulcer tissues of group A, D, E compared with those of the other groups. Using real-time PCR analyses, we found that the level of VEGF mRNA in group A was the highest among the levels of all groups, and the levels in group D and group E were significantly higher than those in group B and group C ($P < 0.05$). In addition, there was no statistically significant difference of serous VEGF level between group A and group E through ELISA analyses. The level of VEGF in serum of group C and group D were lower than those of the other groups. **Conclusion:** Chuyouyuyangmianjian granule may improve the healing of gastric ulcer through upregulating the level of VEGF.

Key Words Chuyouyuyangmianjian granule; Gastric ulcer; VEGF

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.034

胃溃疡是指发生于贲门与幽门之间的炎性坏死性病变,并发症多,愈合较慢,易复发,还有1%的癌变率。其发病机制目前尚不完全清楚,目前认为溃疡的发生时因为侵袭因素,如HP感染,胃蛋白酶等

与保护性因素如表皮生长因子,细胞膜的完整性和再生之间失衡所致^[1]。血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)对胃黏膜细胞有保护作用,能够促进胃肠黏膜上皮增生及维持胃肠道的完整性,在体内、体外均能刺激多种细胞 DNA、RNA 合成。VEGF 能显著增加胃黏膜血流,在防御中起重要作用^[2]。课题组以除幽愈疡免煎颗粒对胃溃疡的疗效干预进行了大量的前期研究,发现除幽愈疡免煎颗粒联合西药治疗胃溃疡,能缩短症状缓解时间、提高 HP 的根治率、减少不良反应。为了更好地评价除幽愈疡免煎颗粒对胃溃疡的疗效机制,本课题将拟从临床到实验,进一步探讨除幽愈疡免煎颗粒对胃溃疡愈合的影响,及 VEGF 在胃溃疡愈合中的作用,以便更好地指导临床治疗。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立及标本采集

将 50 只健康 SD 大鼠,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只:A 组(正常组/对照组)、B 组(模型组)、C 组(西药治疗组)、D 组(中西医结合组)及 E 组(纯中药治疗组)。各组实验用大鼠适应性饲养 2 d,第 3 天禁食 24 h,自由饮水。各组大鼠分别按 2 mL/kg 标准,以 3% 戊巴比妥麻醉后,缚于操作台上,暴露胸腹部,用碘伏在左侧肋缘下腹部消毒,剪 3 cm 切口,暴露肌层,剪开肌内层,用镊子将胃拉出腹腔并展平。在胃窦与胃体交界处注射 100% 冰乙酸 0.02 mL,直至胃浆膜层出现约 3 mm 白色溃疡环,还纳胃于腹腔,逐层缝合肌层、皮肤,碘伏消毒。正常组大鼠实施假手术,操作方法同前,但仅打开腹腔,暴露胃部后,不注射冰乙酸,随即缝合。术后自由饮食。各组大鼠术后第 2 天进行灌胃,分别饲以生理盐水以及治疗组不同药液。药物剂量分别按成人体表面积计算的 2 倍,连续共灌胃 14 d。前 13 d 灌胃期间大鼠正常饮食、饮水,第 14 天禁食、不禁水。A 组:每日按照 1.25 mL/100 g 体重标准用生理盐水灌胃。B 组:每日按照 1.25 mL/100 g 体重标准用生理盐水灌胃。C 组:每次按照 0.132 mg/100 g 体重的奥美拉唑,1.66 mg/100 g 体重的克拉霉素,1.66 mg/100 g 体重的替硝唑,早晚 2 次。连续灌胃 1 周,以后奥美拉唑每日 1 次按照 0.132 mg/100 g 体重再连续灌胃 1 周。D 组:除每日按照 C 组的治疗方法外,加用“除幽愈疡免煎颗粒”。方法是除幽愈疡免煎颗粒 1 包,加水 150 mL 溶化后,每日按照 0.5 mL/100 g 体重标准灌胃。E 组:每日按照 0.5 mL/100 g 体重标准用“除幽愈疡免煎颗粒”灌胃。每周复查体重,及时调

整药量。以上各组大鼠均在末次给药 2~4 h 后处死并取材。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 各组大鼠胃黏膜病理组织形态观察

大体观察各组大鼠胃黏膜色泽,有无皱襞、溃疡、水肿、充血。溃疡的形状、大小、有无坏死、渗出、与周边组织是否粘连等。光学显微镜胃黏膜病理组织形态观察。从靠近溃疡灶或愈合处周围取出胃黏膜组织并以甲醛固定,常规进行石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色,完成后在光镜下观察各组大鼠的胃黏膜形态改变。光镜下观察各组大鼠胃壁结构是否正常,厚度是否增加,有无肉芽组织,黏膜上皮是否完整,腺体排列是否规律整齐,是否有炎性细胞浸润等。

1.2.2 免疫组化检测 VEGF 蛋白的表达

在靠近溃疡灶或愈合处取出胃黏膜组织,并以甲醛固定、常规切片,采用免疫组化检测 VEGF 蛋白表达情况。

1.2.3 各组大鼠 VEGFmRNA 的表达

在靠近溃疡灶或愈合处取出胃黏膜组织,迅速投入液氮中,采用 RT-PCR 方法检测 VEGFmRNA 表达。本实验荧光定量 PCR 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。合成引物如表 1 所示:

表 1 PCR 引物序列表

基因名	序列	扩增长度
Gapdh F	5'-CCATTCCTCCACCTTTGATGCT-3'	215
Gapdh R	5'-TGTTGCTGTAGCCATATTCATTGT-3'	
VEGF-F	5' CAGGGAAGACAATGGGATGA 3'	145
VEGF-R	5'GGGATGGGTTTGTCTGCTTT 3'	

1.2.4 ELISA 检测血浆 VEGF 水平

各组大鼠在触及腹主动脉搏动处穿刺,抽取新鲜动脉血,分离血清,用酶联免疫吸附试验(ELISA)按试剂盒说明书测定血浆中的 VEGF 浓度。

1.2.5 计算溃疡抑制率

用游标卡尺测量各组大鼠溃疡最大长径和垂直径,计算出溃疡面积与溃疡抑制率。计算公式为:面积 = 长 × 宽;溃疡抑制率 = [(模型组溃疡面积 - 治疗组溃疡面积) / 模型组溃疡面积] × 100%。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 16.0 统计软件统计,统计方法采用单因素方差分析,然后用 LSD 法进行组间两两比较,以 $P < 0.05$ 为标准判定有无统计学意义。

2 结果

2.1 溃疡面积及抑制率比较

同模型组相比,中药、西药和中西药组溃疡面积均显著缩小,差异均有

统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) ; 同时分别与西药组、中西药组相比, 中药组溃疡面积均显著缩小, 差异都有统计学意义 ($P < 0.05$) ; 中药组溃疡抑制率为 62.8%, 高于中西药组 27.1% 和西药组 34.6%。见表 2。

表 2 溃疡面积及抑制率的比较

组别	只数	溃疡面积(mm ²)	溃疡抑制率(%)
对照组	10	—	—
模型组	10	26.9 ± 9.98	—
中药组	10	10.1 ± 4.61	62.8
西药组	10	17.6 ± 6.17	34.6
中西药组	10	19.4 ± 6.03	27.1

2.2 光学显微镜观察 正常组大鼠 HE 染色胃壁结构正常, 黏膜上皮完整, 腺体排列规律整齐, 未见明显炎性细胞浸润(见图 1A)。模型组则见胃壁结构破坏, 黏膜出现坏死、缺损, 腺体消失, 细胞排列紊乱, 黏膜层有炎性细胞浸润(见图 1B), 其他治疗组胃壁结构和黏膜恢复较好, 可见胃壁厚度增加, 有新生上皮覆盖, 黏膜下可见肉芽组织, 无明显炎性细胞浸润(见图 1C-E)。中西医结合组、西药组病理表现趋向于正常, 与假手术组相似。

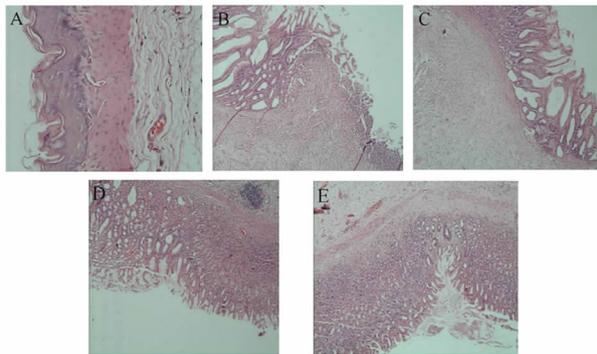


图 1 大鼠胃溃疡黏膜光学显微镜观察(HE 染色, ×100)

注:A-正常组;B-模型组;C-西药组;D-中西医结合组;E-中药组

2.3 各组大鼠胃溃疡组织 VEGF 及 VEGFmRNA 表达的比较

2.3.1 各组大鼠胃溃疡组织 VEGF 蛋白表达的比较 各组大鼠胃溃疡黏膜 VEGF 蛋白的表达: 通过免疫组织化实验分析 VEGF 蛋白在各组大鼠胃溃疡周边组织中的表达分布情况, 实验结果表明(见图 2), 正常组、中药组和中西医结合组大鼠胃黏膜组织 VEGF 蛋白表达水平相当, 其余 2 组 VEGF 蛋白表达较弱。利用 Elisa 分析各组大鼠血清 VEGF 的含量, 5 组数据采用单因素方差分析, $F = 8.87$, $P = 0.0000$, 因此五组均数的差异有统计学意义。由统

计结果(图 3)可知, 中药组血清 VEGF 水平与模型组相当, 差异无统计学意义, 而西药组 VEGF 水平显著低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 这一实验结果与 RT-PCR 及免疫组化结果相一致。

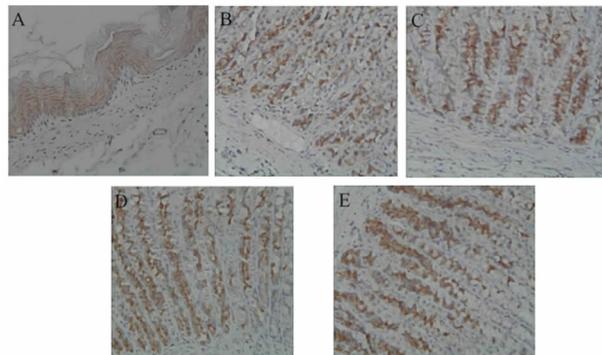


图 2 大鼠胃溃疡黏膜 VEGF 的表达(免疫组化, ×400)

注:A-正常组;B-模型组;C-西药组;D-中西医结合组;E-中药组

2.3.2 各组大鼠胃溃疡组织 VEGFmRNA 表达的比较 1) R-TPCR 检测 VEGF mRNA 水平(见图 4); 2) VEGF mRNA 在胃溃疡组织中的表达结果: 对 5 组实验数据采用单因素方差分析, 分析结果为: $F = 5.87$, $P = 0.0021$, 表明 5 组均数的差别有统计学意义。进一步分析发现, 模型组和西药组 VEGF mRNA 表达水平显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而中药组、中西药组 VEGF mRNA 表达水平则与对照组较为接近, 显示出较高水平的 VEGF mRNA 表达。见表 3, 图 5。

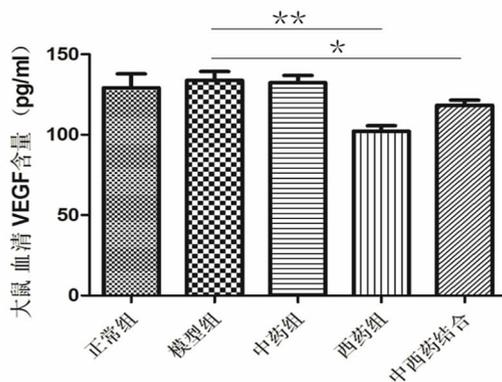


图 3 大鼠血清 VEGF 含量检测结果

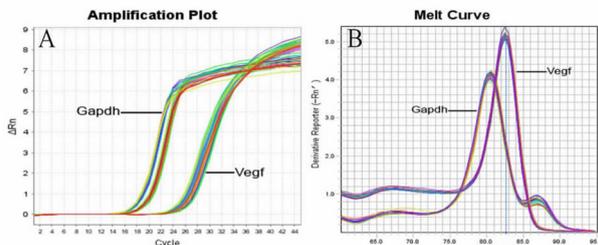


图 4 VEGF mRNA 实时定量 PCR 扩增、溶解曲线图

表 3 各组大鼠胃溃疡组织 VEGF mRNA 表达水平

组别	相对表达量
对照组	1.00 ± 0.04
模型组	0.74 ± 0.04
中药组	0.87 ± 0.19
西药组	0.64 ± 0.54
中西药组	0.72 ± 0.18

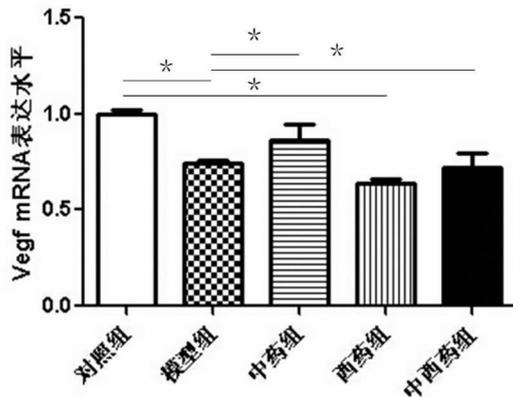


图 5 VEGF mRNA 在胃溃疡组织中表达水平

3 讨论

胃溃疡就是胃黏膜溃烂深达肌层甚至组织全层。溃疡的愈合不仅仅依靠细胞的移行,再次上皮化,而且需要活跃增生的细胞来填补溃疡面的缺损,从而重建胃黏膜的腺体结构^[2],而这一过程需要大量的新生血管为细胞的增生分化提供大量的营养物质。既往研究表明,在胃溃疡的愈合中,最基本的条件是毛细血管网的形成是^[3]。而血管内皮生长因子(VEGF)是现在研究证明的最强的血管生成促进因子,不仅可以增加微血管通透性,促进血浆纤维蛋白外渗,而且可以直接刺激组织内皮细胞的有丝分裂、游走与增殖,在血管生成过程中为多种细胞的迁移提供了纤维网架结构,进而促进毛细血管的生成^[4]。VEGF对胃黏膜细胞有保护作用,在体内、体外均能刺激多种细胞DNA、RNA合成,促进胃肠黏膜上皮增生及维持胃肠道的完整性。同时VEGF能显著增加胃黏膜血流,在胃溃疡防御中起重要作用^[5]。

除幽愈疡免煎颗粒组方以黄芪、党参、白术为君药益气健脾,黄连、知母、蒲公英、丹参、莪术为臣药活血解毒杀HP,佐以白芨、陈皮、厚朴、白花蛇舌草去腐生肌,江清扬等^[6]认为脾虚是溃疡病复发的基础,药理学证实,黄芪、白术能够增强巨噬细胞的吞噬功能从而调节人体的免疫功能^[7]。党参可以抑制胃酸分泌^[8-9],增加胃组织前列腺素的合成^[10]。中

医认为“久病入络”,中药丹参可以改善胃黏膜的血流,促进肉芽组织及上皮细胞的新生^[11]。总之,越来越多的研究证实,中医药能够通过整体调节从而实现局部病变的愈合,有效调节PU的保护因子与攻击因子之间的平衡,从而治疗溃疡的目的。

本动物研究表明,除幽愈疡免煎颗粒可增强胃溃疡大鼠胃组织VEGF及VEGFmRNA的表达,促进血管新生,促进溃疡愈合。因此,我们认为除幽愈疡免煎颗粒能够提高大鼠胃黏膜VEGF水平,而VEGF调控溃疡的愈合过程,提高VEGF水平就能提高溃疡的愈合,从而达到治愈溃疡的目的。

综上,除幽愈疡免煎颗粒是抗溃疡有效药物,其作用机制之一可能是通过提高组织胃组织VEGF及VEGFmRNA的表达,促进微血管及结缔组织的再生,提高黏膜的修复力以及保护能力,从而达到治疗溃疡的最终目的。

参考文献

- [1]袁林,颜天华,王秋娟,等.健胃愈疡片对实验性胃溃疡的影响[J].中草药,2009,40(4):614-617.
- [2]Hui WM,Chen BW,Kung AW,et al. Effect of epidermal growth factor on gastric blood flow in rats: possible role in mucosal protection[J]. Gastroenterology,1993,104(6):1605-1610.
- [3]Ferrara N,Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. Endocr Rev,1997,18(1):4-25.
- [4]Mignatti P,Tsuboi R,Robbins E,et al. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases[J]. J Cell Biol,1989,108(2):671-682.
- [5]Szabo S,Folkman J,Vattay P,et al. Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats[J]. Gastroenterology,1994,106(4):1106-1111.
- [6]江清扬.抗消化性溃疡复发的临床思路和方法[J].中医杂志,1992,33(4):48-50.
- [7]王浴生.中药药理与应用[M].2版.北京:人民卫生出版社,1998:984.
- [8]刘良,王建华,侯宁,等.党参及其有效成分抗胃黏膜损伤作用与机制研究VI:党参部位提取物VII-II对胃分泌、胃血流与胃肠运动的影响[J].中药药理与临床,1990,6(4):20-23.
- [9]韩朴生,姜明瑛,徐秋萍.党参提取物对大鼠实验性胃溃疡和胃黏膜防御因子的影响[J].中药药理与临床,1990,6(1):19.
- [10]刘良,王建华,侯宁,等.党参及其有效成分抗胃黏膜损伤作用与机制研究V:党参部位提取物VII-II对胃组织前列腺素含量的影响[J].中药药理与临床,1990,6(3):9.
- [11]戴建林.灭幽灵治疗消化性溃疡伴幽门螺杆菌阳性40例[J].中国中西医结合杂志,1993,13(9):551.