

# 蒿芩清胆汤对幽门螺杆菌相关性胃炎小鼠血清 IL-8 及胃黏膜 IL-8, NF- $\kappa$ B p65 的影响

张怡<sup>1\*</sup>, 屈杰<sup>1</sup>, 谭万初<sup>2</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

**[摘要]** 目的: 观察蒿芩清胆汤对幽门螺杆菌相关性胃炎(HAG)小鼠血清白细胞介素-8(IL-8)水平及胃黏膜 IL-8、核转录因子  $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65) 的影响, 探讨其对胃黏膜损伤修复的作用机制。方法: 按体重、性别随机抽取 10 只小鼠作为空白对照组, 其他小鼠采用幽门螺杆菌(HP)标准菌株(SS1)布氏肉汤液灌胃造模。造模成功后, 50 只模型小鼠按性别、体重随机分为 5 组, 每组 10 只, 即为模型组、丽珠维三联组(0.25 g·kg<sup>-1</sup>)、蒿芩清胆汤低、中、高剂量组(4, 8, 16 g·kg<sup>-1</sup>)。灌胃容积 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 空白对照组、模型组灌服等体积生理盐水, 1 次/d。2 周后处死动物, 观察各组小鼠胃黏膜病理学改变, 酶联免疫法(ELISA)检测血清 IL-8 含量、免疫组化法检测胃黏膜 IL-8, NF- $\kappa$ B p65 的表达。结果: 与模型组比较, 蒿芩清胆汤能显著降低 HAG 小鼠胃黏膜炎症面积和平均灰度( $P < 0.01$ ); 蒿芩清胆汤明显降低 HAG 小鼠血清 IL-8 含量( $P < 0.01$ ); 蒿芩清胆汤能明显降低 HAG 小鼠胃黏膜 IL-8, NF- $\kappa$ B p65 的表达( $P < 0.05$ )。结论: 蒿芩清胆汤对 HAG 小鼠胃黏膜损伤有明显修复作用, 其机制可能与其抑制 NF- $\kappa$ B p65 的激活、下调 IL-8 的过度表达有关。

**[关键词]** 蒿芩清胆汤; HAG 小鼠; 白细胞介素 8; 核转录因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0152-05

**[doi]** 10.11653/syfy2014020152

## Effects of Haoqin Qingdan Decoction on the Content of IL-8 in Serum and Expression of IL-8, NF- $\kappa$ B p65 in Gastric Mucosa in HAG Mice

ZHANG Yi<sup>1\*</sup>, QU Jie<sup>1</sup>, TAN Wan-chu<sup>2</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Haoqin Qingdan decoction on the content of interleukin 8 (IL-8) in serum and expression of IL-8, nuclear factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) in Gastric mucosa in Helicobacter pylori-associated gastritis (HAG) mice and explore its therapeutic mechanism for Helicobacter pylori (HP) associated gastritis. **Method:** HP standard strains (SS1) brinell broth liquid was used to establish the HAG mice model. Sixty healthy BALB/c mice were randomly divided into six group ( $n = 10$ , each), normal control group (given with equal NS), model group (given with equal NS), livzon weisanlian group (0.25 g·kg<sup>-1</sup>), Haoqin Qindan decoction (4, 8, 16 g·kg<sup>-1</sup>) group. The mice in every group were administrated with drugs by oral gavage once a day. All mice were killed two weeks later, the pathological changes of each group were observed by the microscope, the contents of IL-8 in serum were detected by enzyme-linked immunoassay and the expression of IL-8, NF- $\kappa$ B p65 in gastric mucosa tissue were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with model group, Haoqin Qingdan decoction significantly reduced the inflammation area and average blackness of gastric mucosa in HAG mice ( $P < 0.01$ ); the expression of IL-8 in serum of Haoqin Qingdan decoction groups were

**[收稿日期]** 20130510(007)

**[基金项目]** 四川省科技厅科技计划项目(2013JY0110)

**[通讯作者]** \*张怡, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治脾胃病证的基础与临床研究, Tel: 02887783229, E-mail: zhangyi2288@163.com

significantly lower than that in model group ( $P < 0.01$ ); the expression of IL-8, NF- $\kappa$ B p65 in gastric mucosa of Haoqin Qingdan decoction groups were significantly lower than that in model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Haoqin Qingdan decoction can plays a significant role in the repair of gastric mucosal injury in HAG mice, its therapeutic mechanism may be related to inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B p65 and degrading the expression of IL-8 in the gastric mucosa and serum.

[ **Key words** ] Haoqin Qingdan decoction; HAG Mice; IL-8; NF- $\kappa$ B p65

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP) 感染后发生的胃黏膜炎症称为幽门螺杆菌相关性胃炎 (Helicobacter pylori-associated gastritis, HAG)。我国属 HP 高感染率国家,目前人群中 HP 感染率为 40% ~ 70%<sup>[1]</sup>,与 HAG 的发生率是平行的。机体感染 HP 后少有自发清除,炎症长期持续存在,HAG 患者中约有 15% ~ 20% 会发生消化性溃疡<sup>[2]</sup>,部分可发展为慢性多灶萎缩性胃炎、胃癌等。目前根除 HP 感染的治疗方案已经得到了广泛的认同和推广,但 HP 的耐药性、药物副作用以及治疗成本等因素严重影响了 HAG 的治疗<sup>[3]</sup>。中药能有效抑制和杀灭 HP,有较好疗效<sup>[4]</sup>。蒿芩清胆汤出自清代医家俞根初的《重订通俗伤寒论》,全方清热利湿、和胃化痰,临床上多用于治疗慢性胃炎、功能性消化不良等消化系统疾病<sup>[5]</sup>。本研究通过建立 HAG 小鼠模型,观察小鼠胃黏膜组织病理学改变、检测血清白细胞介素-8 (IL-8) 含量及胃黏膜 IL-8,核转录因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) 表达的变化,探讨蒿芩清胆汤治疗 HAG 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** BALB/c 小鼠,SPF 级,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 22 g,雌雄各半。由四川大学华西医院实验动物中心提供,许可证号 0010805。

**1.2 试剂** 5% 碳酸氢钠溶液 (北京奥博星生物技术有限公司,批号 20111012),IL-8 ELISA KIT (批号 980680W,武汉华美生物工程有限公司),IL-8/cxcl8 (批号 BA1296,博奥森公司),幽门螺杆菌采用国际统一的 SS1 (Sydney strain 1) 菌株,购于中国药品生物制品检定所,超低温保存;菌株培养液由四川大学华西医院提供。

**1.3 仪器** Model550 型酶联免疫检测仪 (美国 BioRad 公司),1575 型洗板机 (北京东方恒伟科技开发公司),Leica RM2246 型切片机 (德国克林蓝公司),Mias2000 型病理分析系统 (湖北徕克医疗仪器有限公司),mage-Pro Plus 型图像分析系统 (Media Cybernetics Inc),倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司),HH-S 型数显恒温水浴锅 (江苏正基仪器有限

公司),TG16-WS 型台式高速离心机 (长沙湘仪离心仪器有限公司)。

**1.4 药物** 蒿芩清胆汤 (青蒿 12 g,竹茹 18 g,法半夏 10 g,茯苓 18 g,黄芩 12 g,枳壳 10 g,陈皮 10 g,滑石 12 g,生甘草 2 g,青黛 4 g) 由四川省中医院提供,按《通俗伤寒论》原方最大剂量折合现代计量单位克 (1 钱 = 3.3 g),将上述饮片加 500 mL 蒸馏水浸泡 30 min 煎煮至药液浓缩至 140 mL 时纱布滤出,4 °C 保存备用。枸橼酸铋钾片/替硝唑片/克拉霉素片 (丽珠维三联),丽珠集团丽珠制药厂。

## 2 方法

**2.1 造模与验证** 按体重、性别随机抽取 10 小鼠作为空白对照组,其余动物造模。参考文献 [6],将 SS<sub>1</sub> 菌株复活后,接种于改良的布氏琼脂培养基 (含 10% 脱纤维羊血),置厌氧罐,在 85% CO<sub>2</sub>、10% N<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> 的环境中,37 °C 条件下培养 72 h。用布氏肉汤洗下纯培养 72 h 的 Hp 菌液备用。禁食 12 h 后,除空白对照组外,其余小鼠均先用 5% 碳酸氢钠溶液灌胃 (0.2 mL/只),30 min 后再用 HP 菌液灌胃 (0.2 mL/只),空白对照组以等量的生理盐水和布氏肉汤灌胃。连续 3 次,每次间隔 48 h。于末次接种后 4 周,禁食 12 h,处死动物,取胃窦组织 3 块,一块进行快速尿素酶实验,另一块经石蜡包埋,切片后进行 Warthin-Starry 染色,进行病理组织学及 HP 检查;剩余一块匀浆稀释后行 HP 培养,标本培养后对可疑菌落革兰染色具有典型特征并且尿素酶实验、触酶试验及氧化酶实验菌阳性判定为 HP 感染,其中两项阳性者,即造模成功。

**2.2 分组与给药** 50 只模型小鼠按性别、体重随机分为 5 组,每组 10 只,即为模型组、丽珠维三联组 (0.25 g·kg<sup>-1</sup>)、蒿芩清胆汤低、中、高剂量组 (4, 8, 16 g·kg<sup>-1</sup>)。灌胃体积 10 mL·kg<sup>-1</sup>,空白对照组、模型组灌服等体积生理盐水,1 次/d,连续 2 周。实验期间密切观察小鼠的一般情况,如体重、粪便、毛发、摄食、活动情况、精神状态等。

**2.3 取材与检测** 小鼠末次给药后,禁食不禁水 12 h,眼眶动脉取血,常温下静置 3 h 后,离心取上

清液,采用酶联免疫法(ELISA),按照试剂盒说明书测定血清 IL-8 含量。剖腹取出全胃,沿胃大弯侧剪开,用生理盐水冲洗,分组放入装有复合固定液的标本瓶中固定。胃窦标本 HE 染色后,观察炎细胞浸润以及胃黏膜腺体情况,分别分析炎细胞数的面积总和、平均灰度;免疫组化观察胃黏膜中 NF- $\kappa$ B p65, IL-8 的表达,采用 Image pro Plus 5.0 图像分析软件,统计每组阳性表达的累计吸光度(A),取平均值进行比较。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般状态** 空白对照组小鼠毛发光泽,活动正常,反映灵敏,食量可,粪便正常,未见死亡。其他各组部分小鼠在造模的第 3 天起可见活动量少,倦卧,饮食、饮水量明显减少,体温偏低,精神萎靡。

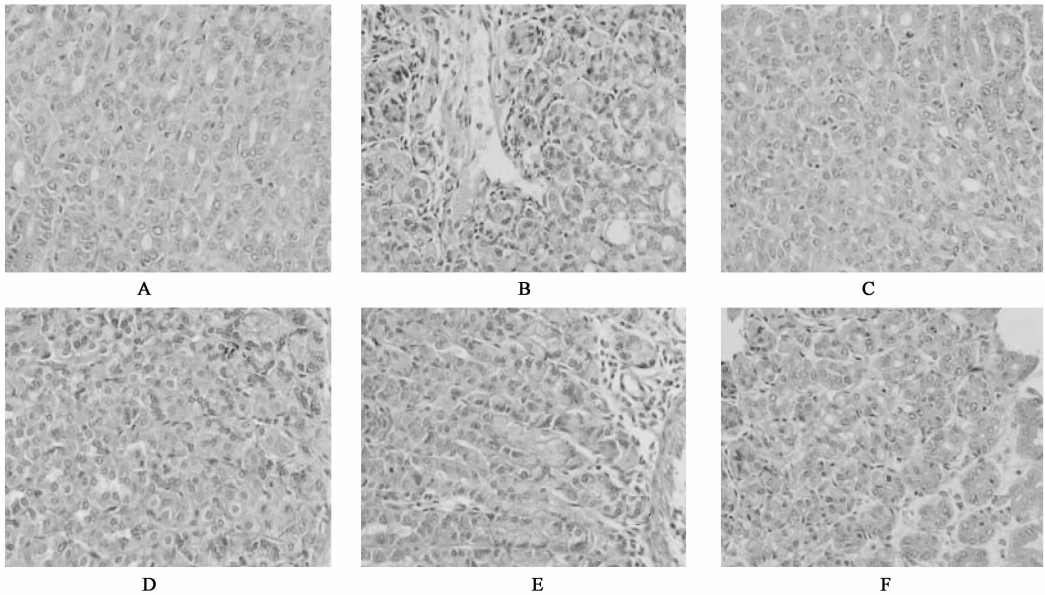
**3.2 胃黏膜病理组织学观察** 空白对照组黏膜单层柱状上皮、腺体结构完整,未见明显炎症细胞浸

润。模型组小鼠胃窦部炎症程度较重,可见较多的淋巴细胞、中性粒细胞浸润,腺体结构模糊。与模型组比较,各治疗组均显著降低了胃黏膜炎症面积和平均灰度( $P < 0.01$ )。蒿芩清胆汤高剂量与丽珠维三联组比较无统计学差异,均低于低、中剂量组( $P < 0.05$ )。见表 1,图 1。

表 1 蒿芩清胆汤对 HAG 小鼠胃黏膜炎症面积和平均灰度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	炎症面积总和/ $\mu\text{m}^2$	平均灰度
空白对照	-	0	0
模型	-	3717.11 $\pm$ 43.94 <sup>2)</sup>	134.69 $\pm$ 6.42 <sup>2)</sup>
蒿芩清胆汤	4	1 803.33 $\pm$ 21.15 <sup>2,4)</sup>	121.29 $\pm$ 3.53 <sup>2,4)</sup>
	8	1 781.54 $\pm$ 14.97 <sup>2,4)</sup>	123.30 $\pm$ 1.90 <sup>2,4)</sup>
	16	1 662.61 $\pm$ 25.71 <sup>2,4,5)</sup>	107.84 $\pm$ 2.64 <sup>2,4)</sup>
丽珠维三联	0.25	1 653.85 $\pm$ 32.57 <sup>2,4,5)</sup>	107.95 $\pm$ 2.35 <sup>2,4)</sup>

注:与空白对照组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较 <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同);与蒿芩清胆汤中、低剂量比较 <sup>5)</sup>  $P < 0.05$ 。



A. 空白对照组;B. 模型组;C. 蒿芩清胆汤 4 g·kg<sup>-1</sup>组;D. 蒿芩清胆汤 8 g·kg<sup>-1</sup>组;  
E. 蒿芩清胆汤 16 g·kg<sup>-1</sup>组;F. 丽珠维三联组(图 2,3 同)

图 1 蒿芩清胆汤对 HAG 小鼠胃黏膜组织的影响(HE 染色,  $\times 200$ )

**3.3 对血清 IL-8 含量的影响** 与模型组比较,各治疗组小鼠血清 IL-8 含量均显著降低( $P < 0.01$ )。组间比较,蒿芩清胆汤低、中剂量组与丽珠维三联组已无统计学差异(表 2)。

**3.4 对胃黏膜 IL-8, NF- $\kappa$ B p65 表达的影响** 与模

型组比较,各治疗组小鼠胃黏膜 IL-8 表达均降低( $P < 0.05$ ),各治疗组组间比较无统计学差异。与模型组比较,各治疗组小鼠胃黏膜 NF- $\kappa$ B p65 表达均降低( $P < 0.05$ )。组间比较无统计学差异(表 2, 图 2,3 同)。

表 2 蒿芩清胆汤对 HAG 小鼠血清 IL-8、胃黏膜 IL-8、NF- $\kappa$ B p65 的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血清 IL-8 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	胃黏膜/IA	
			IL-8	NF- $\kappa$ B p65
空白对照	-	27.97 $\pm$ 1.65	0.17 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01
模型	-	2063.90 $\pm$ 69.68 <sup>2)</sup>	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
蒿芩清胆汤	4	532.43 $\pm$ 32.71 <sup>2,4)</sup>	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>1,3)</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>1,3)</sup>
	8	485.86 $\pm$ 46.44 <sup>2,4)</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>1,3)</sup>	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>1,3)</sup>
	16	559.26 $\pm$ 28.87 <sup>2,4)</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>1,3)</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>1,3)</sup>
丽珠维三联	0.25	520.19 $\pm$ 17.23 <sup>2,4)</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>1,3)</sup>	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>1,3)</sup>

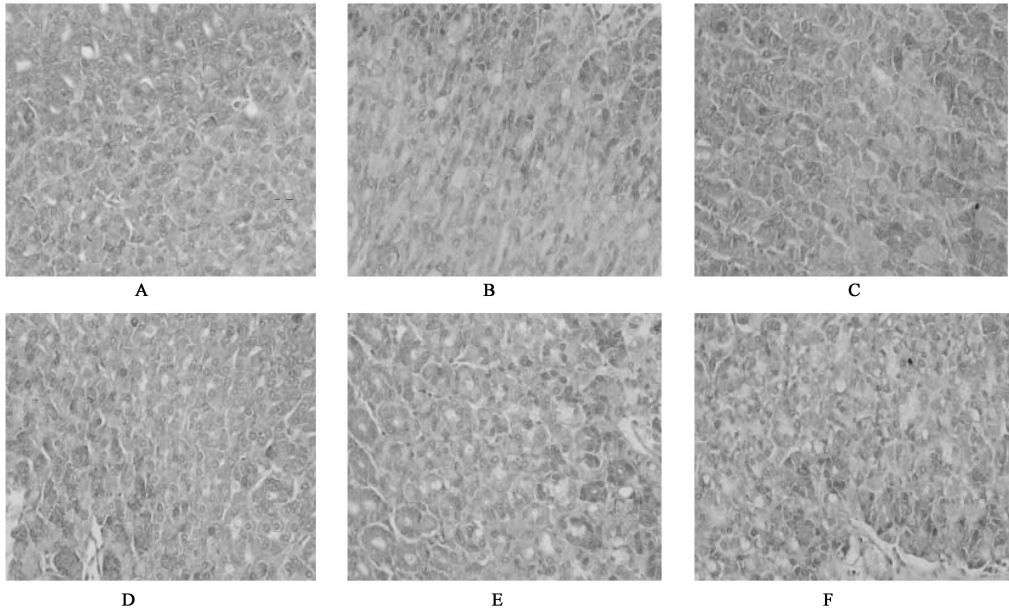


图 2 蒿芩清胆汤对 HAG 小鼠胃黏膜 IL-8 表达的影响(DAB,  $\times 200$ )

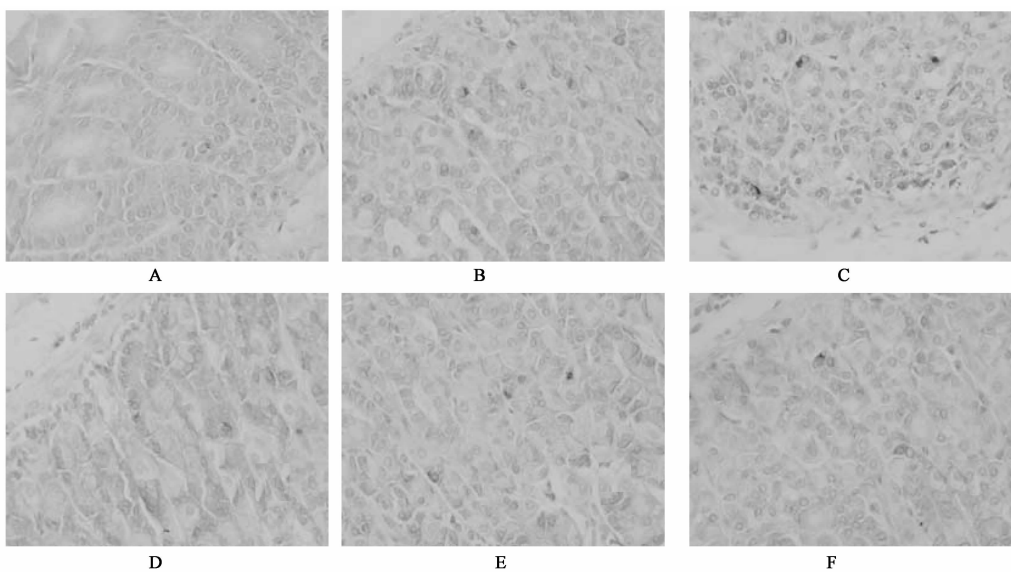


图 3 蒿芩清胆汤对 HAG 小鼠胃黏膜 NF- $\kappa$ B p65 表达的影响(DAB,  $\times 400$ )

#### 4 讨论

中医学认为,HAG 当属“胃痛”、“痞满”等病的范畴。外来 HP 邪气侵袭机体,客于脾胃,引起脾胃功能损伤,脾虚生湿生痰,郁久化热,胃气阻滞,气机升降失常,则发为胃脘痛、痞满、呕吐等症;湿蕴中焦,枢机不利,邪犯胆腑,胆胃不和出现口干、口苦、纳差等症。本病的病位主要在胃,但与脾、肝、胆等关系密切。湿热中阻、胆胃失和是 HAG 的关键病机。大量研究表明<sup>[7-9]</sup>,湿热中阻(脾胃湿热)是 HAG 常见的证候类型,且是 HAG 发展过程中邪气最盛、正邪交争最剧烈的阶段。故治疗当从湿热着手,清热祛湿、利胆和胃为本病治疗大法。蒿芩清胆汤临床上多用于慢性脾胃系疾病的湿热中阻证<sup>[10-11]</sup>,同时药理学研究证实<sup>[12]</sup>,蒿芩清胆汤具有保护实验动物胃黏膜、抑制胃酸分泌、促进胃排空等作用。

现代研究表明<sup>[13-14]</sup>,IL-8 在胃黏膜炎症反应中起重要作用。HAG 患者胃黏膜 IL-8 水平明显高于正常组织,且 IL-8 水平与黏膜组织的活动性、炎症程度呈正相关<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种具有基因转录多向调控作用的转录因子<sup>[16]</sup>,参与炎症因子相关基因的表达及调控<sup>[17]</sup>。当细胞未受到刺激时,NF- $\kappa$ B 与其抑制蛋白(I $\kappa$ B)结合形成复合体。在组织损伤、炎症时 NF- $\kappa$ B 被游离活化,被激活的 NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 解离,主要以 NF- $\kappa$ B 的 p50/p65(激活后经典形式)进入细胞核,上调转录 IL-8 mRNA 使上皮细胞分泌趋化因子,激活中性粒细胞、单核细胞以及引起肥大细胞脱颗粒,释放炎症介质造成胃黏膜的损害<sup>[18]</sup>。NF- $\kappa$ B p65 的活化水平可以代表 NF- $\kappa$ B 的激活程度<sup>[19]</sup>,许多中药通过抑制 NF- $\kappa$ B p65 的表达以减轻黏膜炎症反应。

本次研究表明,蒿芩清胆汤可显著降低 HAG 小鼠血清 IL-8 水平,抑制胃黏膜中的 IL-8、NF- $\kappa$ B p65 的表达,与丽珠维三联治疗效果接近,提示蒿芩清胆汤对 HP 所致胃黏膜损伤有明显的修复作用,其机制可能与其抑制 NF- $\kappa$ B p65 的激活,下调 IL-8 的过度表达,从而减少炎症细胞的浸润有关。

#### [参考文献]

[1] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等.中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J].现代消化及介入诊疗,2010,15(5):264.  
[2] 陆再英,钟南山.内科学[M].北京:人民卫生出版

社,2008:382.  
[3] 成虹,胡伏莲,谢勇,等.中国幽门螺杆菌耐药状况以及耐药对治疗的影响——全国多中心临床研究[J].胃肠病学,2007,12(9):525.  
[4] 周宁,吴琼,孙健,等.中医药防治幽门螺杆菌相关性胃病的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):229.  
[5] 麻春杰,韩雪梅,新燕,等.蒿芩清胆汤在脾胃病中的应用[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(15):65.  
[6] 马志红,牛丽颖,崔利剑,等.胃舒胶囊治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的实验研究[J].中药药理与临床,2005,21(3):41.  
[7] 邹晓华,石美雅,查安生,等.HP 相关性慢性胃炎中医证型分析 302 例[J].内蒙古中医药,2008,29(4):5.  
[8] 罗晓韵,李贺元.脾胃湿热证与幽门螺杆菌相关性研究[J].河南中医,2011,31(10):1090.  
[9] 于鹤轩.蒿芩清胆汤加味治疗慢性胃炎脾胃湿热证临床观察[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(1):97.  
[10] 朱雪琼.蒿芩清胆汤治疗功能性消化不良 35 例[J].吉林中医药,2001,21(6):25.  
[11] 钱占红,任存霞.蒿芩清胆汤对大鼠胃液分泌及胃排空的影响[J].中药药理与临床,2006,22(5):3.  
[12] 孙颖,陈云峰,于海涛.幽门螺杆菌感染与胃黏膜白介素-8 表皮生长因子含量的关系[J].中国临床保健杂志,2008,11(6):576.  
[13] 张春玲.血清细胞因子与幽门螺杆菌相关性胃炎之间的关系[J].中国实用医刊,2012,39(14):22.  
[14] 李兆申,湛先保,许国铭,等.胃黏膜损伤与保护-基础与临床[M].上海:上海科学技术出版社,2004:396.  
[15] Timothy S, Blackwell, John W Christman. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation[J]. Am J Res Pir Cell Mol Biol,1997,17(1):3.  
[16] Chen C J, Yang H I, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level[J]. AMA,2006,295(1):65.  
[17] 曹萍,卢启明.核因子- $\kappa$ B 与幽门螺杆菌相关性胃炎[M].国外医学:消化系疾病分册,2009,25(4):228.  
[18] Schoonbroodt S, Piette J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathway[J]. Biochem Pharmacol,2000,60(8):1075.  
[19] 任守忠,郭建生,李鑫,等.安胃丸对慢性胃炎大鼠血清炎症因子及胃黏膜核因子- $\kappa$ B 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):198.

[责任编辑 李玉洁]