

藿香正气液对湿阻证大鼠抗氧化作用 及对胃黏膜 EGFR 表达的影响

薛晓倩¹, 黄学宽^{1*}, 高宁², 刘鄂湖², 任凌燕³

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; 2. 第三军医大学生药学教研室, 重庆 400038;
3. 重庆科技学院化学化工学院, 重庆 401331)

[摘要] 目的: 研究藿香正气液对湿阻证大鼠抗氧化作用及对胃黏膜表皮生长因子受体(EGFR)表达的影响。方法: 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、藿香正气液组, 每组 8 只。正常组常规喂养, 其余各组采用改进的环境加疲劳法制造湿阻证模型, 连续造模 6 d。造模成功后, 正常组和模型组予生理盐水 ig(20 mL·kg⁻¹), 治疗组予藿香正气液 ig(20 mL·kg⁻¹), 1 次/d, 连续 8 d。采用比色法检测血清中褪黑素(MT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)的含量变化, 并用免疫组化方法观察胃黏膜 EGFR 表达的情况。结果: 与正常组相比, 模型组大鼠脾虚症状明显, 胃黏膜有明显充血水肿, 并有出血点及血块, 血清 MT 及 GSH-Px 含量降低($P < 0.05$), MDA 含量增高($P < 0.05$); 经藿香正气液治疗后, 与模型组比较, 血清 MT 及 GSH-Px 含量增高($P < 0.05$), 而 MDA($P < 0.05$)含量降低; 免疫组化结果显示模型组大鼠胃黏膜 EGFR 表达减少($P < 0.05$), 藿香正气液组则明显增加($P < 0.05$)。结论: 藿香正气液可明显改善湿阻证大鼠脾虚症状并对胃黏膜损伤有保护作用, 其机制可能与增强机体抗氧化应激能力及提高胃黏膜 EGFR 的表达量有关。

[关键词] 藿香正气液; 湿阻证; 胃黏膜; 表皮生长因子受体; 抗氧化作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0230-05

Effects of Huoxiang Zhengqi Liquid on the Anti-oxidation and Expression of EGFR in Gastric Mucosa of Rats with Dampness Retention Syndrome

XUE Xiao-qian¹, HUANG Xue-kuan^{1*}, GAO Ning², LIU E-hu², REN Ling-yan³

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China;
2. Department of Pharmacognosy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;
3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University
of Science and Technology, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Huoxiang Zhengqi liquid on the anti-oxidation and expression of the epithelial growth factor receptor (EGFR) in gastric mucosa of rats with dampness retention syndrome (DRS). **Method:** Twenty-four SD rats were randomly divided into 3 groups: control group, DRS group and treatment group (DRS + Huoxiang Zhengqi liquid), 8 rats in each group. DRS was induced in all rats, except the control group, by modified environmental and fatigued method for 6 days. After DRS model was formed, control and DRS group were lavaged with normal saline (NS, 20 mL·kg⁻¹). Rats in treatment groups were lavaged with Huoxiang Zhengqi liquid (20 mL·kg⁻¹) for 8 days. Then the content of melatonin (MT),

[收稿日期] 20120309(014)

[基金项目] 重庆市卫生局科技项目(2009-2-114)

[第一作者] 薛晓倩, 在读硕士, 从事中西医结合基础研究, Tel:15523836932, E-mail:hrx200808@163.com

[通讯作者] *黄学宽, 副教授, 硕士生导师, 从事心脑脾肾疾病及肿瘤的基础研究与临床, Tel:13452382058, E-mail: xkhuang2002@163.com

glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) in serum were determined by colorimetric method and the expression of EGFR on gastric mucosa was determined by immunohistochemistry. **Result:** Rats of model groups exhibited typical DRS, with sign of hyperaemia, edema, hemorrhagic spots and sludged blood in the gastric mucosa compared to control. The content of MT, GSH-Px in serum decreased ($P < 0.05$), while the content of MDA in serum increased ($P < 0.05$), and the expression of EGFR in gastric musoca significantly decreased in DRS group compared to that of control group ($P < 0.05$). Conversely, exposure of DRS rats to Huoxiang Zhengqi liquid resulted in increase in the content of MT and GSH-Px in serum ($P < 0.05$ versus DRS group) and the expression in EGFR in the gastric mucosa ($P < 0.05$, versus DRS group), and decrease the content of MDA in serum ($P < 0.05$ versus DRS group). **Conclusion:** Huoxiang Zhengqi liquid could have the protective effect on DRS-induced gastric mucosal injury, increasing anti-oxidation and expression of EGFR may play an important role.

[Key words] Huoxiang Zhengqi liquid; dampness retention syndrome; gastric mucosa; EGFR; anti-oxidation

湿阻证为临床常见脾胃病证之一,是指湿邪阻滞中焦脾胃,以全身困重倦怠、胸脘痞闷、腹胀纳呆、口黏苔腻为主要临床表现的病症^[1]。当湿邪损伤脾胃,使胃黏膜出现充血、水肿等损伤后,炎症介质释放等病理变化导致自由基的大量产生,从而进一步加重胃黏膜的损伤,通过检测血清丙二醛(MDA)含量则可以了解机体自由基的产生,检测血清褪黑素(MT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量则可反应机体抗氧化系统的功能状态^[2-3]。而表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)则是原癌基因 C-erbB-1 (HER-1)的表达产物,该受体及其所介导的信号转导参与调节胃黏膜上皮更新和修复过程^[4]。藿香正气方剂源于宋代《太平惠民和剂局方》,由藿香、半夏曲、陈皮、白术、茯苓、大腹皮、厚朴、紫苏、白芷、桔梗、炙甘草组成,具有解表化湿、理气和中等作用,主治外感风寒、内伤湿滞诸证。经长期实践证实其对改善胃肠道多种症状疗效显著^[5]。随着其剂型的变化,其在临床中运用十分广泛,但目前对其作用机制的研究较少,本课题拟观察藿香正气液对湿阻证大鼠抗氧化作用及对胃黏膜 EGFR 表达的影响,以期进一步了解其改善胃肠道症状的可能机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠(85 ~ 110 d 龄)24 只,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,生产许可证号 SCXK(渝)2007-0001。

1.2 药品与试剂 藿香正气液(太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,批号 09050567),MT, GSH-Px, MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),乌来糖(国药集团化学试剂有限公司),S-P Rabbit HRP Kit

(DAB)兔 Streptavidin-HRP 试剂盒、EGFR 一抗(北京康维世纪生物科技有限公司)。

1.3 仪器 切片机(LEZCARM2135),电热恒温水浴箱(WSZ-261-79HW1),BMJ-III型包埋机,BH-2型光学显微镜(日本 Olympus),显微摄影仪(Olympus),GD-8病理摄像多媒体分析仪(日本 Olympus),752紫外光栅分光光度仪(上海精密仪器公司)等。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 将24只SD大鼠适应性喂养1周后,随机分为正常组、模型组、藿香正气液组共3组,每组8只。正常组常规喂养,其余各组采用改进的环境加疲劳法^[6]进行造模:保持实验室温度(28 ± 2)℃,将大鼠放入水深25 cm、水温(26 ± 1)℃的水池中游泳15 min,游毕取出,立即给予4℃的蒸馏水ig,体积为20 mL·kg⁻¹,然后将动物置于笼底盛有4 mm水深的饲养笼中饲养,自由进食与饮水。上述操作1次/d,连续6 d,末次造模后换入正常环境中饲养。造模期间,注意观察造模大鼠的精神状态、活动、大便、进食及体重情况,实验室温度不可过低,否则会出现动物死亡。造模成功后,从开始,正常组和模型组予生理盐水ig(20 mL·kg⁻¹),治疗组予藿香正气液(20 mL·kg⁻¹),1次/d,连续8 d ig治疗^[7]。

2.2 血清 MT, GSH-Px, MDA 检测 在末次给药后禁食不禁水12 h,按20%乌拉坦5 mL·kg⁻¹体重进行麻醉,眼球采血3 ~ 5 mL,静置1 ~ 2 h,4 000 r·min⁻¹离心10 min,分离血清,取上清液,低温(4℃)保存待测。按试剂盒说明,用比色法检测血清 GSH-Px 活性,MT,MDA 的含量。

2.3 胃黏膜 EGFR 蛋白表达 颈椎脱臼处死大鼠,

然后开腹摘取全胃,沿胃小弯剪开,4 ℃ 生理盐水清洗胃内容物,肉眼观察胃黏膜情况,并刮取胃黏膜组织,每块大小约 0.5 cm × 1.0 cm,迅速置于 4% 多聚甲醛固定液中固定 24 h。

2.3.1 免疫组化步骤(S-P 法) ①将组织从固定液中取出,石蜡包埋,切片(厚 4 μm)→贴于防脱玻片→60 ℃ 烘烤 1 h。逐级二甲苯脱蜡两次,每次 5 min;再依次浸入梯度乙醇和蒸馏水中各 5 min 水化。②热修复:组织切片于 10 mol·L⁻¹,pH 6.0 柠檬酸缓冲液中煮沸 10 ~ 20 min,室温冷却 20 min。滴加内源性过氧化物酶封闭液,室温孵育 10 min,PBS 充分淋洗。③滴加封闭用正常羊血清工作液,室温孵育 10 min,甩干。④滴加一抗(兔单克隆抗体 IgG,按 1:100 稀释)工作液,每张切片约 50 μL 左右,按实验要求孵育,放入湿盒,置 4 ℃ 冰箱过夜,次日取出用 PBS 充分淋洗。⑤滴加生物素标记羊抗兔二抗工作液,室温孵育 10 min,PBS 充分淋洗。⑥显色:每张片加 DAB 50 μL 左右显色(DAB 显色工作液配置:试剂 A 和试剂 B 以 1:19 的体积比混匀)显色时间一般为 1 ~ 5 min→镜下观察控制显色反应,自来水冲洗终止显色。⑦苏木精浅染 8 min,自来水冲洗后 1% 盐酸乙醇分化 10 s,自来水冲洗,饱和碳酸锂返蓝 10 s,自来水冲洗,梯度乙醇分别脱水 10 s→二甲苯透明后封片,显微镜下观察、摄影。对照试验方法:空白对照用 PBS 替代一抗进行上述免疫组化反应。

2.3.2 结果判定方法 以胞膜和胞浆内出现棕黄色颗粒为判定标准,按阳性区域表达由强至弱区分为:强阳性(卅)、阳性(++)、弱阳性(+)、阴性(-)^[8]。GD-8 病理摄像多媒体分析仪在电脑上对图片进行分析,由电脑自动得出每张片的灰度值和

吸光度(A),再求出平均值。

2.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件,数据分析时先进行正态性检验,然后进行单因素方差分析。若满足方差齐性,用 LSD 法和 Dunnett 进行分析;若方差不齐,则用 Tamhane's T2 进行分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察 与正常组相比,模型组大鼠出现精神萎靡、活动减少、懒动、游泳坚持时间缩短、呛水时间较早、便溏、脱毛、食量及饮水量减少、体重下降等表现。而经藿香正气液治疗后,大鼠体重、饮食等一般情况均有明显改善,而精神萎靡、倦怠乏力症状消失,活动增加,大便正常,且无脱毛等现象。

3.2 大鼠胃黏膜观察 造模后大鼠胃黏膜充血、水肿明显,有小出血点及凝血块;而通过藿香正气液治疗后,大鼠胃黏膜损伤得到修复,无充血、水肿、出血及凝血块等表现。

3.3 大鼠血清 GSH-Px 活性,MT,MDA 含量 与正常组相比,模型组大鼠血清 MT 含量,GSH-Px 活性降低($P < 0.05$),而 MDA 含量增高($P < 0.05$);与模型组比较,藿香正气液组大鼠血清 MT 含量,GSH-Px 活性增加($P < 0.05$),而 MDA($P < 0.05$)明显降低。(表 1)。

3.4 大鼠胃黏膜 EGFR 的表达 与正常组相比,模型组大鼠胃黏膜 EGFR 表达量明显减少,平均灰度值明显增加($P < 0.05$),平均光密度值明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,藿香正气液组大鼠胃黏膜 EGFR 表达明显增加,其表达主要在胃底腺细胞的细胞膜和细胞质,细胞核不着色,着色均呈均匀的褐色,平均灰度值均明显降低($P < 0.05$),平均光密度值明显增高($P < 0.05$)。(表 2,图 1)。

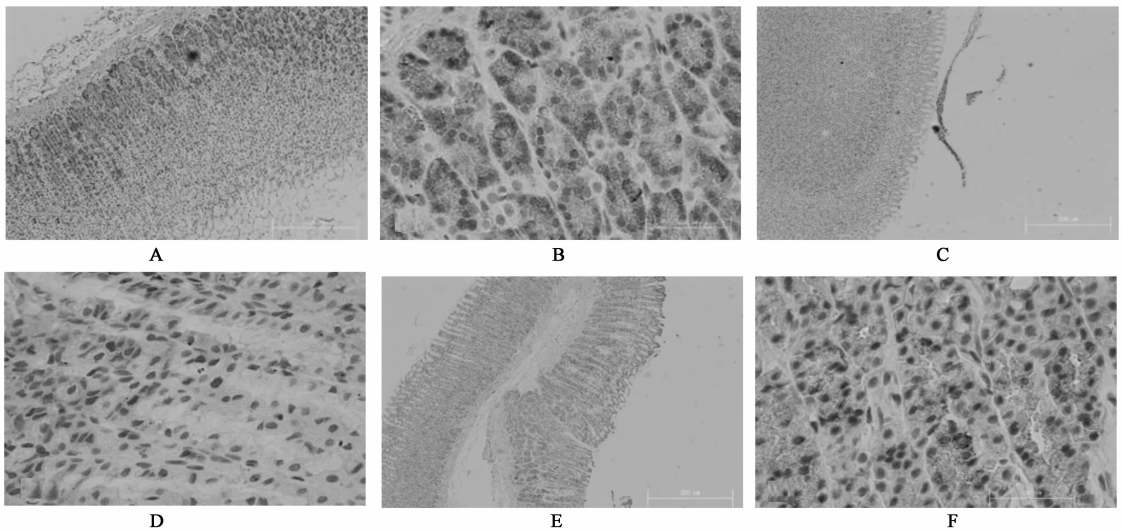
表 1 各组大鼠血清 MT,GSH-Px,MDA 的变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mL·kg ⁻¹	MT /ng·L ⁻¹	GSH-Px /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹
正常	-	11.53 ± 1.98	493.22 ± 81.92	4.64 ± 0.74
模型	-	9.68 ± 1.48 ¹⁾	368.10 ± 52.92 ¹⁾	19.43 ± 3.49 ¹⁾
藿香正气液	20	11.30 ± 2.23 ^{1,2)}	433.04 ± 84.67 ^{1,2)}	8.65 ± 1.79 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 各组大鼠胃黏膜 EGFR 的表达($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	阳性区域显色强度	灰度值	A
正常	-	卅	129.475 ± 14.505	0.200 ± 0.035
模型	-	- ~ ±	166.013 ± 7.757 ¹⁾	0.025 ± 0.193 ¹⁾
藿香正气液	20	++	141.305 ± 10.236 ^{1,2)}	0.104 ± 0.059 ^{1,2)}



A, B. 正常组; C, D. 模型组; E, F. 藿香正气液 20 mL·kg⁻¹ 组
图 1 各组大鼠胃黏膜 EGFR 的表达 (S-P 法: A, C, E. ×10; B, D, F. ×100)

4 讨论

中医认为,湿与脾的关系最为密切,故《素问·至其要大论》说:“诸湿肿满皆属于脾”。可见,湿邪致病每易伤脾,而脾失健运也易滋生内湿,若湿邪阻滞中焦脾胃,则易发为泄泻、便秘^[9]、水肿、腹胀、饮食减少、神疲乏力、少气懒言等病症^[10]。而藿香正气液是临床常用的除湿中成药,具有解表化湿、理气和中之功^[11],而且经临床长期实践证实,其对改善胃肠道多种症状疗效显著。我们的实验研究也发现,藿香正气液可明显改善湿阻证大鼠脾虚腹泻等症状,其机制可能与提高回肠黏膜 ZO-1 的表达有关^[12]。可见,本实验选用湿阻证作为研究对象,观察传统除湿中成药藿香正气液对湿阻证大鼠抗氧化作用及对胃黏膜 EGFR 表达的影响,是一个颇具中医传统特色的研究课题。

现代研究证实,湿邪可引起一系列以胃肠消化、吸收及运动功能障碍为主的综合征候群,且与各种原因导致的胃炎、胃溃疡等相似。表现为胃黏膜充血、水肿、糜烂或伴有出血点等急性炎症改变,组织学特点则以淋巴细胞、浆细胞浸润为主^[7];光镜下也可见大鼠小肠黏膜糜烂,绒毛肿胀,上皮变性、坏死、脱落^[13]。而此时的炎症介质释放等病理变化则可能导致自由基的大量产生,从而加重胃黏膜的损伤。MT 是由松果体分泌的一种神经激素,具有抗感染、抗氧化、抗应激等作用,是目前已知体内抗氧化作用最强的自由基清除剂^[2],其抗脂质过氧化物的能力是维生素 C 和维生素 E 的 10 多倍,被誉为体内自由基的“清道夫”,并能增强内源性抗氧化酶的作

用^[14]。GSH-Px 则是重要的抗氧化酶系,有对抗自由基损伤和清除氧自由基、降低细胞内 H₂O₂ 水平、减少氧化物蓄积等作用^[15],它主要通过特异性催化还原型谷胱甘肽对过氧化物的还原反应,使线粒体膜脂质过氧化反应减轻,稳定细胞生物膜而发挥作用。因此,可将 GSH-Px 作为判断抗过氧化能力的重要指标^[16]。MDA 则是脂质过氧化反应的最终代谢产物,在血清和组织中的含量可反映机体脂质氧化的速度和强度,在损伤早期检测血清 MDA 含量则可反应胃肠氧化应激状态,因此,也可将其作为过氧化损伤的诊断指标^[3]。本实验结果显示,模型组大鼠血清 MDA 的含量增高,血清 MT 与 GSH-Px 的含量降低,提示湿阻证大鼠体内自由基有所增加,体内脂质过氧化能力远大于抗氧化的能力,自由基的增加还可进一步加重胃黏膜的损伤。而用藿香正气液治疗后,大鼠血清 MDA 含量降低,而血清 MT 与 GSH-Px 的含量也明显增高,说明藿香正气液能通过增强大鼠机体抗氧化能力和抑制自由基的生成,从而对胃黏膜产生保护作用。

众所周知,胃肠黏膜屏障是胃肠道最重要的一道屏障,其中胃黏膜上皮细胞层是位于黏液下的第二道且重要的屏障,其表面存在一层磷脂,具有疏水性,而其疏水性的变化可以导致胃黏膜完整性的改变^[17]。EGFR 是 HER-1 的表达产物,属于跨膜受体酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, TPK) 家族,主要集中在胃黏膜胃腺颈区(增殖带)壁细胞、颈黏液细胞的细胞膜和细胞质中,并以细胞膜为主,在正常机体胃黏膜的上皮细胞、固有膜细胞及黏膜肌细

胞皆有 EGFR 的少量表达,而以胃黏膜上皮细胞的分布为最多^[4]。B Chun 等研究发现在幽门螺杆菌所致的胃黏膜损伤中,EGFR 表达增加,且以胃窦部增加为主,在幽门螺杆菌清除后则可恢复到正常水平,说明 EGFR 的上调能对损伤的胃黏膜起修复作用^[18]。也有研究发现,黏膜损伤的修复可以分为 3 个阶段,EGFR 主要在修复的早期阶段 30 min 至 2 h 发挥作用^[19]。而 EGF 通过与其受体 EGFR 结合并激活后,作为自分泌或旁分泌生长因子诱导 EGFR 磷酸化,提供持续分裂信号到细胞内并产生胞内级联反应,引起细胞增殖、分化而发挥作用^[20],并且能明显抑制胃酸分泌,认为其是调节溃疡愈合的中介^[21]。本实验结果显示,模型组大鼠腹胀、纳少、体重等脾虚症状明显,胃黏膜 EGFR 表达量显著降低,而用藿香正气液治疗后,上述症状明显改善,胃黏膜充血、水肿消失,也无血凝块,胃黏膜 EGFR 的表达也明显升高。可见,藿香正气液改善湿阻证大鼠纳少、体重减轻等症以及对胃黏膜损伤的修复作用,可能与通过提高胃黏膜 EGFR 的表达量有关。

综上所述,藿香正气液治疗湿阻证所致脾胃损伤的机制,即对胃黏膜的保护和修复作用,可能与提高机体自身抗氧化能力和提高胃黏膜 EGFR 的表达密切相关,但其机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 郭先玲. 湿阻病的临床辨证探讨[J]. 新疆中医药, 2010,28(2):9.

[2] 刘利兵,刘芳娥,张磊,等. 褪黑素对睡眠剥夺大鼠胃黏膜损伤的影响及其机制[J]. 第四军医大学学报, 2008,29(7):613.

[3] 刘连,徐园园,许洁,等. 氟中毒大鼠血清中 NO 和 MDA 及 GSH-Px 的研究[J]. 现代预防医学,2010,37(6):1108.

[4] 钟艳,严洁. 表皮生长因子受体与胃黏膜损伤修复的研究进展[J]. 中外健康文摘:医药月刊,2008,5(5):175.

[5] 王巧兰. 藿香正气方剂药理作用与临床[J]. 海峡药学,2007,19(9):85.

[6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:191.

[7] 韩志刚,黄学宽,刘群英,等. 化湿液对湿阻证大鼠胃黏膜损伤修复的影响[J]. 中药材,2008,31

(12):1849.

[8] 郑伟,汪宝军,叶立民. 灰度值、光学密度值与免疫组化片阳性表达强弱的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2003,19(5):566.

[9] 梁自平,冯汉财,陈延. 达原饮治疗湿阻便秘经验略谈[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):227.

[10] 薛晓倩,黄学宽,高宁,等. 化湿液对湿阻证大鼠血清 D-木糖及 Ghrelin 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):206.

[11] 李康,陈思亮,周文良,等. 中药藿香正气水对大鼠结肠平滑肌收缩的机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):131.

[12] 薛晓倩,黄学宽,高宁,等. 藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):224.

[13] 韩志刚,黄学宽,杨俊卿. 化湿液对湿阻证大鼠小肠黏膜损伤的影响[J]. 医学动物防制,2011,27(10):946.

[14] Rosa D P, Bona S, Simonetto D, et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats[J]. Arq Gastroenterol, 2010,47(1):72.

[15] 聂黎虹,赵瑞宁,丁娟,等. 苦参碱对急性心肌缺血大鼠血清 MDA、SOD 和 GSH-Px 的影响[J]. 宁夏医学杂志,2008,30(6):501.

[16] 聂海,黄显凯,赖西南,等. 舱内腹部爆炸伤大鼠血清及肠道组织 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活力变化及意义[J]. 第三军医大学学报,2008,30(10):910.

[17] 李成龙,屠伟峰. 胃黏膜屏障保护机制的研究进展[J]. 广东医学,2008,29(2):334.

[18] B CHUN. YU WONG, W PING WANG, et al. Epidermal growth factor and its receptor in chronic active gastritis and gastroduodenal ulcer before and after elicobacter pylori eradication [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2001,15(9):1459.

[19] Ari Fahrial Syam, Mohammad Sadikin, Septelia Inawati Wanandi. Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer [J]. Acta Med Indones-Indones J Intern Med, 2009,4(2):95.

[20] 林辉. 疏肝和胃丸对大鼠胃黏膜组织 EGFR 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2008,26(1):304.

[21] 王会丽,贾欣,白静,等. 普胃丸对慢性胃溃疡大鼠胃组织中 EGF 和 EGFR 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):148.

[责任编辑 聂淑琴]