

清浊安中汤对慢性胃炎脾胃湿热证 大鼠模型细胞凋亡及 Bcl-2 的影响

李合国^{1*}, 劳绍贤²

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨清浊安中汤治疗脾胃湿热证作用机制及脾胃湿热证大鼠模型建立。方法:50 只大鼠随机分为正常对照组、胃炎脾虚证组、胃炎脾胃湿热证组、清浊安中汤高、低剂量组,以 2% 水杨酸钠、番泻叶 100% 水煎液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,连续 20 d,复制胃炎脾虚证。采用“病证结合”方法,以 2% 水杨酸钠 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃) + 高脂 (20% 蜂蜜水) 高糖 ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + 人工气候箱复制脾胃湿热证大鼠模型并用清浊安中汤 ($2, 1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 对脾胃湿热证大鼠模型防治,常规 HE 胃黏膜病理组织染色、TUNEL (原位末端标记法) 检测细胞凋亡、SABC (免疫组化) 法检测 Bcl-2 蛋白表达。结果:脾胃湿热证组 10 只大鼠均有轻-重度炎症,细胞凋亡指数 0.236 ± 0.021 , Bcl-2 蛋白表达 0.247 ± 0.041 ;脾胃湿热证大鼠模型表现出症状、体征与临床相符,胃黏膜炎症较正常组重而与脾虚证组无差异,细胞凋亡较脾虚组轻而 Bcl-2 蛋白表达大于脾虚组 ($P < 0.05$),清浊安中汤防治组对此有改善治疗作用。结论:大鼠模型符合脾胃湿热证属性,调节细胞凋亡和 Bcl-2 蛋白表达可能是清浊安中汤治疗脾胃湿热证作用机制之一。

[关键词] 慢性胃炎; 脾胃湿热证; 细胞凋亡; Bcl-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0189-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1152.023.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 11:52

[收稿日期] 20120109(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30271572)

[通讯作者] *李合国,副主任医师,医学博士,从事中西医结合消化系统疾病的临床和科研工作, Tel: 15936236629, E-mail: lhg1964@163.com

[参考文献]

- [1] Lau G Chan C L. Massive hepatocellular neerosis; was it eased by Orlistat? [J]. Med Sei Law, 2002, 42(4): 3.
- [2] 翁小刚, 朱晓新, 杨庆, 等. 非酒精性脂肪肝的实验研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 104.
- [3] 姜国贤, 余传友, 丁爱民, 等. 柔肝煎治疗脂肪肝的临床研究 [J]. 中国医药指南, 2008, 12(6): 184.
- [4] 康学东, 余臣祖, 朱瑾. 化浊颗粒治疗大鼠非酒精性脂肪肝的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 18(9): 200.
- [5] 徐英敏, 张大伟, 蒋士卿. 祛痰化痰汤治疗痰瘀内阻型非酒精性脂肪肝 35 例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 296.
- [6] 王建青. 豹皮樟总黄酮对非酒精性脂肪性肝炎的治疗作用及部分机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007: 58.
- [7] 肖碧跃, 赵国荣, 贺又舜, 等. 理脾护肝调脂丸对脂肪肝大鼠肝脏 MDA, SOD 影响的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 230.
- [8] 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制 [J]. 世界华人消化杂志, 1999, 1(1): 3.
- [9] 陈丽, 张绪东, 焦杨, 等. 玉郎伞提取物对食饵性高脂血症大鼠肝脏脂蛋白代谢相关酶活性及脂肪肝的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 254.
- [10] Roger D, Shanlin F U, Roland S. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation [J]. Biochem J, 1997, 324: 18756.
- [11] Mantena S K, King A L, Andringa K K, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(7): 1259.

[责任编辑] 聂淑琴

Influence of Qingzhuo Anzhong Decoction on Apoptosis and Bcl-2 in Rat Model with Splenogastric Hygropyrexia Syndrome of Chronic Gastritis

LI He-guo^{1*}, LAO Shao-xian²

(1. First Affiliated Hospital of Henan Traditional Chinese Medicine (TCM) College, Zhengzhou, 450000, China; 2. Guangzhou TCM University, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study mechanism of Qingzhuo Anzhong decoction in treating splenogastric hygropyrexia syndrome (SHS) of chronic gastritis. **Method:** The 50 rats were randomly divided into normal control group, gastritis splenasthenic syndrome group, gastritis splenogastric hygropyrexia group, traditional Qingzhuo Anzhong decoction high dose, low dose 2, $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ prevention and cure group. The rats were given corresponding drugs by intragastric administration for 20 days. The gastritis splenasthenic syndrome model, gastritis damp-heat syndrome model, and gastritis damp-heat syndrome model were induced by mean of 2% sodium salicylate, honey, fats, senna leaf, the artificial climate box and Qingzhuo Anzhong decoction. The inflammation situation of gastric mucosa were observed by using gastroscop and common pathological staining method. The protein expression of gastric mucosa Bcl-2 was detected by immunohistochemistry. The cell apoptosis of gastric mucosa was detected by the home position terminal sign notation. **Result:** There all were lightly-hyperphlogosis, apoptotic index being 0.236 ± 0.021 , Bcl-2 proteinum expression 0.247 ± 0.041 in 10 rats of splenogastric hygropyrexia group. The gastritis damp-heat syndrome rat model appeared some symptoms and physical sign. The rat gastritis splenic asthenia group and gastritis moist heat group were quite serious in gastric mucosa inflammation, compared with the normal group, the difference was significant ($P < 0.05$). In SHS group Bcl-2 protein expresses was more obvious than that in splenic asthenia group and the normal group ($P < 0.05$). The cell apoptosis index of SHS group and splenasthenic syndrome group was larger than the normal group ($P < 0.05$), but SHS group was lower than spleen asthenic syndrome group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Adjusting apoptosis, Bcl-2 protein expresses may be one of mechanisms of Qingzhuo Anzhong decoction.

[Key words] chronic gastritis; splenogastric hygropyrexia syndrome; apoptosis; B-cell lymphoma-2

清浊安中汤是导师劳绍贤教授临床多年经验方,对脾胃湿热证患者有良好的临床疗效^[1]。动物模型作为科研的必要补充,对深入系统地研究脾胃湿热证的病因与发病,筛选开发防治脾胃湿热证的中药新药,提高临床疗效,具有十分重要作用,而临床研究^[2-3]表明脾胃湿热证存在细胞凋亡、Bcl-2 变化。因此开展脾胃湿热证动物模型复制探讨具有重要意义。本研究主要探讨该方作用机制及通过以药测证客观评价动物模型。

1 材料

1.1 动物 选用 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 $(180 \pm 2) \text{ g}$;广州中医药大学试验动物中心提供。合格证号粤检证字 2004A014 号。

1.2 药物 番泻叶 100% 水煎剂;100% 水煎液清浊安中汤(白豆蔻 10 g,厚朴 12 g,黄芩 12 g,法半夏 12 g,猪苓 15 g,郁金 12 g,台乌药 15 g,滑石

12 g。制备方法:中药用凉水 500 mL 浸泡 30 min,武火煮沸,改文火煮取液浓缩至 100% 水煎液,4 ℃ 冰箱保存备用)。

1.3 试剂 细胞凋亡检测试剂盒 [Kit, POD, mk1020 标记缓冲液,末端脱氧核糖核酸转移酶, DIG-dUTP,生物素化抗地高辛抗体, SABC, ProteinaseK, 抗体稀释液,阳性对照片; Rabbit Anti-Bcl-2 (BA0412): 0.1 mL , $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 30% glycerol;即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒 (SA1022-兔 IgG): 5% BSA 封闭液,二抗, SABC, 复合消化液,抗原修复液; DAB 显色试剂盒 (AR1022): 显色剂 A,显色剂 B,显色剂 C],上述试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器 LRH-800-GS 人工气候箱;YC-DZOZ 亚都超声加湿器;DS-88 型高精度数学电子天平; TP1020 生物组织自动脱水机,EG1140 包埋机,

RM2025 切片机;YT-6 生物组织烤片机;Metamorph

4.5 图像分析系统;SPOT II 照相软件。

2 方法

2.1 动物与分组 大鼠 50 只,雌雄各半。适应性喂养 3 d 后,随机分为 5 组,每组 10 只,分正常对照组、胃炎脾虚证组、胃炎湿热证组、清浊安中汤高、低剂量防治组。

2.2 脾胃湿热证大鼠模型复制与中药防治组实施
正常组:正常喂饲,清水 ig, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 20 d。胃炎脾虚证组:以 2% 水杨酸钠 ig, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 20 d;同时非喂饲日 ig 番泻叶 100% 水煎液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,隔日喂饲,喂饲日饲料量不限,造模 20 d,建立慢性胃炎脾虚证模型。胃炎脾胃湿热证组:以 2% 水杨酸钠 ig, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 20 d,建立慢性胃炎模型;同时饲以高脂高糖饮食,即 20% 蜂蜜水自由饮用,隔日 ig 油脂 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;15 d 后放入人工气候箱中,温度为 $(32 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为 95%,每天 12 h,共 5 d。清浊安中汤防治组:造模方法同胃炎脾胃湿热证组,在放入人工气候箱中之前加服清浊安中汤 2, $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,容积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续 20 d 在人工气候箱造模时间后再继续 ig 中药 5 d。

2.3 标本采集处理 试验结束后,禁食 12 h,次日用乌拉坦 ip 麻醉,麻醉后颈椎脱臼处死,迅速剖腹,分离并沿大弯侧剪开鼠胃,取胃体、胃窦组织黏膜各约 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$ 两块,放入 4% 多聚甲醛固定液中,24 h 后石蜡包埋,用于做组织病理学、细胞凋亡、Bcl-2 蛋白表达的检测标本。

2.4 观察指标与检测方法

2.4.1 一般体征 观察大鼠外观、精神状态及食量、引水量、体重、粪便情况。

2.4.2 胃黏膜病理组织学检测 采用常规 HE 染色的方法,具体步骤略。

2.4.3 细胞凋亡检测 原位末端标记法(TUNEL)技术,具体步骤见说明书。

细胞凋亡指数 = 每张片 5 个视野阳性表达细胞吸光度 (A)/5

2.4.4 Bcl-2 免疫组化检测 采用 SABC 法,具体步骤见说明书。

Bcl-2 蛋白表达 = 每张片 5 个视野阳性表达细胞 A/5

2.5 统计学方法 所有计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均值比较采用独立样本 *t* 检验;多组间均值的比较用单因素方差分析,组间均值的两两比较用 SNK 法;用统计软件 SPSS 11.5 软件完成。

$P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的主要症状与体征变化 正常组:大鼠体重逐日增加,活动正常,食欲良好,大便正常,背毛光泽,反应灵活,小便淡黄。胃炎脾虚组:大鼠于施加番泻叶水煎剂 ig 后当天出现腹泻,并一直持续到结束。实验过程中体重逐渐减轻,形体消瘦,倦缩聚堆,疲倦,懒动,眯眼,弓背,食量少,拉尾排便次数增多,大便稀溏,肛门污秽,小便淡黄。胃炎湿热组:前期大鼠体重无明显增加,精神倦怠,饮水量逐渐减少,放入人工气候箱后前述症状更明显,体重减轻,并出现烦躁不安,毛发疏松粗糙,阴囊松弛下垂,大便不成形或稀便,纳呆少饮,小便黄量少。治疗组:治疗前基本同胃炎湿热组变化,经清浊安中汤治疗后,饮食与体重均有明显增加,毛色较前光亮,精神状态明显好转,大便成形或软便,小便黄,量正常。

3.2 大鼠胃黏膜病理情况 胃炎脾虚大鼠胃镜下胃黏膜可见不同程度的充血水肿,黏液附着;和脾虚证相比,脾胃湿热证大鼠充血水肿更为明显,多可伴有糜烂或出血点,胃黏液糊量偏多;病理检查均见炎性细胞和淋巴细胞浸润。清浊安中汤组大鼠黏膜充血、糜烂减轻。见表 1。

表 1 各组大鼠胃黏膜炎症程度比较 ($n=10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胃黏膜炎症分级动物数/只			
		无	轻度	中度	重度
正常对照	-	8	2	0	0
胃炎脾虚证	- ¹⁾	1	5	3	1
胃炎脾胃湿热证	- ¹⁾	0	2	5	3
清浊安中汤	2 ²⁾	2	5	2	1
	1 ²⁾	2	4	3	1

注:与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.05$; 与胃炎脾胃湿热证组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 各组大鼠胃黏膜细胞凋亡和 Bcl-2 蛋白表达 显微镜下观察,凋亡细胞为细胞核呈棕黄色阳性染色细胞,见于壁细胞、主细胞、上皮细胞和间质细胞。Bcl-2 蛋白表达阳性细胞:显微镜下观察,细胞质染棕黄色,见于壁细胞、主细胞、上皮细胞和间质细胞。见表 2。

4 讨论

4.1 综合因素对实验大鼠的影响 本实验大鼠在炎症因子 + 肥甘饮食 + 外部湿热作用下,其食量、体重、证候的变化与正常组相比更加明显,与临床脾胃

表 2 各组大鼠胃黏膜细胞凋亡和 Bcl-2 蛋白表达情况的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) A

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	细胞凋亡指数	Bcl-2 蛋白表达
正常	-	0.074 ± 0.042	0.082 ± 0.025
胃炎脾虚证	-	0.293 ± 0.037 ¹⁾	0.178 ± 0.032 ¹⁾
胃炎脾胃湿热证	-	0.236 ± 0.021 ^{1,3)}	0.247 ± 0.041 ^{1,3)}
清浊安中汤	2	0.187 ± 0.071 ²⁾	0.147 ± 0.024 ²⁾
	1	0.171 ± 0.063 ²⁾	0.130 ± 0.012 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$;与胃炎脾胃湿热组相比²⁾ $P < 0.05$;与胃炎脾虚组相比³⁾ $P < 0.05$ 。

湿热证相符,其证候特征较单一因素造模更突出,印证了中医脾胃湿热证发病学说及机制。光镜下实验大鼠胃炎脾虚组、脾胃湿热组与治疗组的胃黏膜可见明显炎症改变,与正常组有明显区别,证实 2% 水杨酸钠对大鼠胃黏膜致炎作用,经清浊安中汤治疗后,炎症程度得到不同改善。

4.2 大鼠胃黏膜细胞凋亡、Bcl-2 蛋白表达变化
实验大鼠胃黏膜细胞凋亡,脾虚证组与脾胃湿热证组均高于正常组,且两证之间亦有差别,经防治后,脾胃湿热证的胃黏膜细胞凋亡减轻,但没有达到正常水平。这说明脾胃虚实证候具有不同的细胞凋亡病理生理基础,清浊安中汤具有防治细胞凋亡的作用。实验大鼠胃黏膜 Bcl-2 蛋白表达,脾虚证组与脾胃湿热证组均强于正常组,且两证之间亦有差别,经防治后,脾胃湿热证的胃黏膜 Bcl-2 蛋白表达下调,但没有达到正常水平。这说明脾胃虚实证候在细胞基因调控水平方面存在差异,可能是同一疾病却有不同临床症状和辨证分型的机制之一。

4.3 以药测证及清浊安中汤对脾胃湿热证大鼠模型的细胞凋亡、Bcl-2 蛋白表达的影响
由于证候的复杂多样性,动物模型是否符合中医辨证的要求,单依据动物模型表现出来的中医症状难以确认,而药物反证的检验方法则有助于客观评价动物模型。但以药测证的药物必须具有较高的特异性和稳定性,否则就难以反证“证”的属性。

清浊安中汤专为脾胃湿热证而设,其药物具有双向调节作用,既可兴奋低下的胃肠运动,又可抑制

亢进胃肠运动^[4],有的还具有抗菌消炎、解热镇痛、增强免疫、利尿解毒等多种作用。白豆蔻能促进胃液分泌,增强肠管蠕动,制止肠内异常发酵,驱除胃肠积气,且能止呕,其低浓度煎剂对豚鼠离体肠管呈兴奋作用,高浓度则可抑制;黄芩及黄芩苷可拮抗乙酰胆碱所致小鼠肠痉挛,抑制肠管蠕动,还具有解热、消炎、利尿、增强免疫的作用;厚朴煎剂低浓度时可兴奋小鼠离体肠管平滑肌,高浓度时则呈抑制作用,还能拮抗胃酸分泌;半夏可抑制小鼠胃液分泌,降低胃液酸度,抑制应激性胃溃疡的发生,促进家兔胆汁分泌,增强肠道的输送能力;猪苓具有利尿、增强免疫、抗菌、抗衰老等多种作用;乌药可使麻醉犬在位肠肌蠕动加速,收缩加强,其煎剂能使胃电图幅值、频率明显增高,还能增加消化液的分泌^[5]。郁金煎剂可增加胃酸分泌,提高血清中胃泌素和胰泌素的浓度,并可使十二指肠中碳酸氢根浓度增高^[6]。

在本实验中,清浊安中汤无论从证候或胃黏膜炎症改善、细胞凋亡等方面均表现为良好的改善或治疗作用。“以药测证”证实本次研究的脾胃湿热证大鼠模型具备临床脾胃湿热证的属性。

[参考文献]

[1] 欧阳宏,劳绍贤.清浊安中汤对脾胃湿热证患者胃泌素和胃动素及生长抑制素含量的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2002,10(6):326.

[2] 李灿东,高碧珍,兰启芳,等.慢性胃炎脾胃湿热证患者胃黏膜细胞及相关蛋白的研究[J].中国中西医结合杂志,2002,22(9):667.

[3] 高碧珍,兰启芳,李灿东,等.慢性胃炎证候与幽门螺杆菌及 Bcl-2 蛋白的相关性研究[J].福建中医学院学报,2003,13(6):1.

[4] 庞龙,周德端.中药对胃肠运动的调节作用[J].华人消化杂志,1998,6(6):535.

[5] 梅全喜,毕焕新.现代中药药理手册[M].北京:中国中医药出版社,1998:207,73,358,222,161,346,227.

[6] 蔡永敏,任玉让,王黎,等.最新中药药理与临床应用[M].北京:华夏出版社,1999:308.

[责任编辑 聂淑琴]