

枳实消痞丸配合西药对幽门螺杆菌感染小鼠 胃黏膜上皮细胞 Fas 蛋白表达的影响

孙英英¹, 刘景超^{2*}, 李伟², 刘淑君³, 李具双², 包京霖¹

(1. 河南中医学院第三附属医院, 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 郑州 450008;
3. 河南省舞阳县中心医院, 河南 舞阳 462400)

[摘要] **目的:** 观察枳实消痞丸配合西药对幽门螺杆菌(Hp)感染小鼠胃黏膜上皮细胞 Fas 蛋白表达的影响, 探讨中西药合用提高幽门螺杆菌感染相关性胃炎疗效的作用机制。**方法:** 采用 5% NaHCO₃ 溶液及幽门螺杆菌国际标准菌株 SS1 灌喂 BALB/c 小鼠, 建立 Hp 感染动物模型。对造模动物分别投以中药、西药和中西药联用, 分别采用 HE 染色、TUNEL 法和免疫组化(sABC 法)观察胃黏膜损伤程度(LI)、细胞凋亡指数(AI)和 Fas 蛋白表达的变化。**结果:** 3 个治疗组均能抑制胃黏膜上皮细胞 Fas 蛋白的过高表达, 模型组表达为(28.30 ± 2.36)%, 抑制程度中西药合用组 > 西药组 > 中药组 [Fas 表达依次为(15.50 ± 2.39)%, (22.0 ± 1.90)%, (25.90 ± 2.34)%]; 3 个治疗组对胃黏膜损伤有不同程度的改善, 中西药合用组强于单用中药组、西药组 [LI 依次为(1.10 ± 0.18), (1.80 ± 0.25), (1.30 ± 0.26)分]; 3 个治疗组能对抗 Hp 所引起的细胞凋亡增加, 模型组、中药组、西药组、中西药合用组 AI 依次为(16.60 ± 1.74)%, (11.60 ± 1.11)%, (8.70 ± 0.88)%, (5.10 ± 0.67)%, 合用组抑制作用最强。**结论:** 对细胞凋亡和胃黏膜上皮细胞 Fas 蛋白表达的抑制可能是枳实消痞丸合用西药三联提高幽门螺杆菌感染相关性胃炎疗效的机制之一。

[关键词] 幽门螺杆菌; 动物模型; 枳实消痞丸; 西药; Fas 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0237-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1737.014.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:37

Influence of Zhishi Xiaopi Pills Combined with Western Medicine on Fas Protein Expression in Gastric Epithelial Cells in Rats with Helicobacter Pylori Infection

SUN Ying-ying¹, LIU Jing-chao^{2*}, LI Wei², LIU Shu-jun³, LI Ju-shuang², BAO Jing-lin¹

(1. Third Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

3. Central Hospital of Wuyang County, Wuyang 462400, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Zhishi Xiaopi Pills combined with western medicine on Fas protein expression in gastric epithelial cells in rats with *Helicobacter pylori* infection and to explore the related mechanism. **Method:** BALB/c mice were fed with NaHCO₃ solution of 5% and *Helicobacter pylori* (Hp) strains SS1 international standards to establish Hp infection, and randomly divided into three groups: the Chinese medicine group, the western medicine group, and the Chinese medicine combined with western medicine group. The injury of gastric mucous membrane, cell apoptosis index and epithelial cell expression of Fas were investigated by HE staining, Tunel method and immunohistochemical evaluation (SABC). **Result:** In three groups, the over-expression of epithelial Fas protein could be inhibited by the interventions. The model group expression was (28.30 ± 2.36)%, while the Chinese medicine combined with western medicine group, the western medicine

[收稿日期] 20120227(199)

[通讯作者] * 刘景超, 教授, 从事历代名医学术思想与经验研究, Tel: 13526802951, E-mail: liujingch2001@gmail.com

group and the Chinese medicine group were $(15.50 \pm 2.39)\%$, $(22.0 \pm 1.90)\%$, $(25.9 \pm 2.34)\%$ accordingly. The inhibition degree appeared to be the Chinese medicine combined with western medicine group > the western medicine group > the Chinese medicine group. In the three groups, the injury of gastric mucous membrane was improved to different degree. The Chinese medicine combined with western medicine group showed less injury (lesion index $LI = 1.10 \pm 0.18$) compared with the western medicine group (1.30 ± 0.26) and the Chinese medicine group (1.80 ± 0.25) . As cell apoptosis was concerned, the apoptosis index in the Chinese medicine combined with western medicine group $(5.10 \pm 0.67)\%$ was smaller than those in the western medicine group $(8.70 \pm 0.88)\%$ and the Chinese medicine group $(11.60 \pm 1.11)\%$. The model showed an index of $(16.60 \pm 1.74)\%$. **Conclusion:** Zhishi Xiaopi Pills combined with western medicine can improve *Helicobacter pylori*-induced gastric injury. The mechanism may be related to inhibition of cell apoptosis and inhibition of expressions of Fas protein in gastric epithelial cells.

[**Key words**] *Helicobacter pylori*; animal model; Zhishi Xiaopi Pills; western medicine; Fas protein

幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是全球最常见的感染源之一。大量资料显示 Hp 感染与胃、十二指肠疾病关系极为密切。在多数国家,超过 90% 的十二指肠溃疡患者和将近 70% 的胃溃疡患者伴有 Hp 感染。目前 Hp 作为慢性活动性胃炎主要的发病原因已被认识^[1],并且被认为与胃癌的发生有密切关系^[2]。1994 年, Hp 已被世界卫生组织定为 I 类致癌物。临床上已肯定慢性活动性胃炎患者的胃黏膜中 Hp 的检出率可高达 90% 以上,经 Hp 敏感的抗菌药物治疗后,在 Hp 消失的同时伴有胃黏膜组织学的改善及症状的好转。因此根除 Hp 是治疗慢性胃炎、消化性溃疡和预防胃癌的重要环节。

在西药治疗 Hp 感染方面,虽然目前国际上推崇的三联疗法具有较高的根除率,但由于耐药株的出现,导致治疗失败率增加。另外,三联治疗可出现恶心、呕吐、食欲减退及腹泻等不同程度的副作用,据报道有 5% ~ 20% 的患者因不能耐受而停止治疗^[3]。中医药在治疗幽门螺旋杆菌感染相关性慢性胃炎方面取得了一定进展,但也存在着侧重解毒祛邪,或者单方面辅助正气,忽视益气散滞、扶正去邪的倾向^[4]。

根据中医理论,我们认为“气虚标实”是幽门螺旋杆菌感染相关性慢性胃病的主要病机。鉴此,本实验以 Hp 感染的 BALB/c 小鼠为研究对象^[5],以胃黏膜损伤程度、细胞凋亡指数和 Fas 蛋白表达水平为指标,评价枳实消痞丸配合西药的治疗效果,并与单用西药、中药组进行比较,以期寻找更有效的根除 Hp 治疗方案。

1 材料

1.1 动物 54 只无特殊病原菌 (Specific pathogen free, SPF) 雌性 BALB/c 小鼠,7 ~ 8 周龄,体重 26 ~

31 g,由河南省实验动物中心提供,许可证号 SYXX (豫)2005-0012。动物实验在郑州大学医学院无菌动物房进行,饲养和实验条件符合 SPF 级动物要求。

1.2 Hp 菌株及培养 实验用 Hp 菌株为国际标准菌株 SS1 (Sydney strain 1) (获赠于郑州大学医学院)。将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 Hp 菌株 SS1 涂布于布氏琼脂培养基,在一定湿度 (98%)、微需氧 ($5\% \text{ O}_2$, $8\% \text{ CO}_2$, $80\% \text{ N}_2$)、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h 后,从菌落形态、尿素酶试验、硝酸盐试验、革兰染色等方面对 Hp 感染的有无及其程度进行鉴定。

1.3 药物及试剂 枳实消痞丸按照原方剂量 (枳实、干姜、厚朴、黄连、姜半夏、人参、茯苓、白术、制甘草、麦芽) 水煎提取,甲硝唑片 (山西亚宝药业集团股份有限公司,批号 050528),枸橼酸铋钾胶囊 (郑州韩都药业集团有限公司,批号 050316),阿莫西林胶囊 (广州白云山制药有限公司,批号 4050345),凋亡指数 (AI) 检测试剂盒、Fas 检测试剂盒、Bcl-2 检测试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司 (批号 200409),胃幽门螺杆菌诊断 pH 指示剂法诊断试剂盒 (福建三强生物化工有限公司,批号 20051001)

1.4 仪器 无菌操作台 (苏州净化设备有限公司)、电热恒温培养箱 (天津市华北实验仪器有限公司)、光学显微镜 (Olympus-CH20)。

2 方法

2.1 Hp 动物造模及判定 取 7 ~ 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,禁食不禁水 12 h 后,ig $5\% \text{ NaHCO}_3$ 0.2 mL/只,30 min 后 ig $1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Hp 菌液 0.5 mL,6 h 后予以投食,隔日 1 次,连续 3 次。造模后 1,2 周,禁食 12 h 后各处死造模小鼠 2 只,取全胃,沿大弯剪开,用生理盐水漂洗。取 1/2 胃黏膜组

织行快速尿素酶试验及幽门螺杆菌培养(接种时直接将胃黏液面与布氏肉汤琼脂培养基接触,涂抹),另取 1/2 胃组织用 10% 甲醛溶液固定、石蜡包埋切片后行 HE 染色。根据“中华医学会第二届全国 Hp 专题研讨会”确定的 Hp 科研诊断标准,尿素酶试验、细菌培养、HE 染色检测阳性者,为造模成功。

2.2 分组给药 取 Hp 造模成功小鼠 40 只,随机分为中西药联用组(枳实消痞丸 $24.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ + 西药三联)、中药组(枳实消痞丸 $24.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、西药组(西药三联,即枸橼酸铋钾 $72.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、阿莫西林 $300.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、甲硝唑 $150.17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、模型组、空白对照组(正常饮食),连续给药 14 d。

2.3 取材 末次投药后,禁食 12 h,颈椎脱臼法处死小鼠,取全胃,沿大弯剪开,取 1/2 胃组织用 4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋制片。

2.4 指标观察

2.4.1 胃黏膜损伤程度的病理组织学观察 胃黏膜切片,HE 染色,光镜下观察病理组织学改变。参考 Eric^[6] 法,计算胃黏膜损伤指数(lesion index, LI):胃黏膜浅层未见明显病变为 0 分;病变限黏膜浅层上 1/3、上皮细胞变性、黏膜充血水肿、少许出血糜烂、黏膜浅层炎性细胞浸润者为 1 分;病变达黏膜浅层上 2/3,明显点片状出血糜烂,黏膜层及黏膜下层中性白细胞浸润为 2 分;病变累及黏膜整个浅层为 3 分。

2.4.2 胃黏膜上皮细胞 AI 的检测 采用 TUNEL 技术进行检测。石蜡切片常规脱蜡、脱水处理后,加入含有 TdT 和 DIG-d-UTP 的标记液,20 μL 于湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 标记 2 h,洗净后,加入生物素化抗地高辛抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,洗净后加 SABC 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,洗净、脱水、封片,显微镜观察。结果判定:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞。选取染色典型的 5 个以上连续视野,人工计数 1 000 个以上胃黏膜细胞中阳性细胞总数,计算阳性细胞百分率即凋亡指数。

2.4.3 胃黏膜上皮细胞凋亡蛋白 Fas 蛋白的表达

采用免疫组织化学染色方法(SABC 法)进行观察,切片常规脱蜡、水化后,滴加 5% BSA 封闭液,室温反应 20 min,滴加兔抗 Fas 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 h,PBS 洗净后滴加适量山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。PBS 洗净后室温 DAB 显色,苏木素轻度复染、脱水、封片。结果判定:选取染色典型的 5 个以上连续视野,人工计数 1 000 个以上胃黏膜细胞中

阳性细胞总数,计算阳性细胞的百分率。细胞膜或浆着色,呈棕黄色者为阳性反应。

2.5 统计学分析 应用 SPSS 11.5 统计软件 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 胃黏膜损伤情况 模型组的胃黏膜损伤与空白组相比有明显差异($P < 0.01$),各治疗组损伤程度均有明显改善,3 个用药组的改善程度依次为中西药组 > 西药组 > 中药组,中西药组优于中药组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 枳实消痞丸对小鼠胃黏膜损伤情况的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$) 分

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	LI
空白	-	$0.10 \pm 0.10^{1)}$
模型	-	2.10 ± 0.18
枳实消痞	24.6	$1.80 \pm 0.25^{1)}$
三联		$1.30 \pm 0.26^{1)}$
枳实消痞 + 三联	$24 \pm$ 三联	$1.10 \pm 0.18^{1,2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与中药组比较²⁾ $P < 0.05$;³⁾ 西药三联为枸橼酸铋钾 $72.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,阿莫西林 $300.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,甲硝唑 $150.17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 胃黏膜细胞的凋亡情况 与正常组相比,胃黏膜细胞凋亡指数(AI)自中西药组、西药组、中药组、模型组以次呈增高趋势。给药 3 个组与模型组比有显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),中西药合用组比中药、西药单用组作用强($P < 0.01, P < 0.05$),见表 2。

表 2 枳实消痞丸对胃黏膜上皮细胞凋亡情况的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	AI
空白	-	$3.30 \pm 0.42^{2)}$
模型	-	16.60 ± 1.74
枳实消痞	24.6	$11.60 \pm 1.11^{2)}$
三联		$8.70 \pm 0.88^{1)}$
枳实消痞 + 三联	$24.6 \pm$ 三联	$5.10 \pm 0.67^{2,3,4)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与中药组比较³⁾ $P < 0.01$;与西药组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 胃黏膜细胞 Fas 蛋白表达情况 模型组与正常组相比,Fas 蛋白的表达显著增高($P < 0.01$),给药 3 个组 Fas 蛋白的表达均有明显降低($P < 0.01, P < 0.05$),中西药组的抑制作用强于西药组($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 胃黏膜细胞 Fas 蛋白表达情况的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Fas 蛋白表达
空白	-	12.20 ± 1.93 ²⁾
模型	-	28.30 ± 2.36
枳实消痞	24.6	25.90 ± 2.34 ¹⁾
三联		22.00 ± 1.90 ²⁾
枳实消痞 + 三联	24.6 + 三联	15.50 ± 2.39 ^{2,3,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.01$;与中药组比较³⁾ $P < 0.01$;与西药组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

Hp 感染导致的慢性胃炎、胃溃疡等属于中医学“胃脘痛”、“心下痞”等范畴,病变部位在胃,但与肝、脾等密切相关。若外邪犯胃、饮食伤胃、情志不畅皆可导致脾虚不运、胃失和降而致病,其基本病机多以脾胃虚弱、寒热互结、气机阻滞者为常见。脾胃虚弱、运化失司、升降失调,可导致气滞血瘀、寒热互结,为 Hp 的附着、定植、繁殖提供了客观条件,脾虚是疾病产生的根本,扶正祛邪是治疗疾病的基本法则。

枳实消痞丸出自《兰室秘藏》,由枳实、厚朴、黄连、半夏、干姜、人参、茯苓、白术、麦芽、炙甘草组成,具有行气消痞、健脾和胃之功效。现代药理研究表明^[5]:枳实对幽门螺旋杆菌有显著的杀灭作用;厚朴具有影响胃肠活动、抗菌、抗病毒等作用;党参含皂苷及党参碱,能增加消化液的分泌,调节胃肠运动,可助消化;白术含苍术醇和苍术酮,为健脾要药,可促进胃肠消化液的分泌助消化,对各种细菌有抑菌作用;半夏、黄连、干姜、麦芽等具有抑制胃酸分泌、收敛保护胃肠黏膜的作用。临床观察表明^[6],枳实消痞丸配合西药三联对改善临床症状、促使胃黏膜修复以及清除 Hp 等方面都明显优于西药单用与中药单用组,且毒副作用较轻,是治疗 Hp 感染相关性胃炎的理想组合。

近年来发现 Hp 感染与胃黏膜上皮细胞凋亡之间有着密切的联系,Moss 等^[7]首先利用脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)技术对 Hp 感染与胃黏膜上皮细胞凋亡间的关系进行研究,发现 Hp 阳性的患者胃黏膜 TUNEL 标记的阳性细胞明显增加,而 Hp 阴性对照组凋亡细胞极少,提示

Hp 感染可导致胃黏膜上皮细胞凋亡蛋白的表达异常。本研究发现, Hp 感染小鼠在给予中药、西药及中西药治疗后,胃黏膜上皮细胞 AI 明显降低,中西药联用组又优于西药组和中药组,表明 Hp 感染可以诱导胃黏膜上皮细胞的凋亡,中西药联合应用较单独应用西药、中药治疗具有更好的抑制胃黏膜上皮细胞凋亡的效果。Fas 抗原广泛存在于多种组织来源的细胞表面,是最早发现的细胞凋亡相关蛋白之一^[8]。本研究发现, Hp 感染小鼠在给予中药、西药及中西药治疗后,胃黏膜上皮细胞 Fas 蛋白表达呈明显下降,其中以中西药治疗组最为显著。

综上,本研究结果表明,对于 Hp 感染小鼠,枳实消痞丸配合西药三联疗法在减轻胃黏膜损伤、抑制胃黏膜细胞凋亡等方面都明显优于西药单用与中药单用组,中西药合用治疗 Hp 感染相关性胃炎的作用机制可能与抑制 Fas 蛋白过度表达相关。

[参考文献]

- [1] 刘文忠. 幽门螺杆菌研究进展[M]. 上海:上海科技文献出版社,2001:183.
- [2] 胡宏雷. 幽门螺杆菌感染与胃癌关系的研究现状[J]. 华中医杂志,2005,29(5):398.
- [3] 张万岱,萧树东,胡伏莲,等. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见[J]. 世界华人消化杂志,2004,12(10):2457.
- [4] 卞兆祥,劳绍贤,王继德,等. 清热理气方对螺杆菌感染性胃炎的作用[J]. 广州中医药大学学报,2000,17(1):60.
- [5] 窦丹波,王松波,蔡金淦,等. 枳实消痞丸方及其拆方对大鼠胃排空及血浆胃动素的影响[J]. 现代消化及介入治疗杂志,2002,7(2):33.
- [6] 林江,唐静芬,蔡金淦. 枳实消痞丸对大鼠胃排空影响的实验研究[J]. 中华消化杂志,1999,19:45.
- [7] Moss S F, Calam J, Agarwal B, et al. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*[J]. Gut, 1996,38:498.
- [8] Houghton J, Korah R M, Condon M R, et al. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway[J]. Dig Dis Sci, 1999,44(3):465.

[责任编辑 何伟]