

清幽益胃灵抗幽门螺杆菌阳性胃病的实验研究

刘维明*, 黄丹青, 赵延春

(山东中医药大学第二附属医院, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 研究清幽益胃灵的主要药理作用。方法: 观察该药对胃幽门螺杆菌的抗菌作用; 观察对小鼠免疫功能的影响; 观察对人体胃粘膜组织的修复能力及药物的急性毒性实验。结果: 清幽益胃灵有明显抗幽门螺杆菌、提高免疫功能、改善胃粘膜微环境、增强组织修复能力的作用。

[关键词] 清幽益胃灵; 抗菌; 免疫功能; 修复作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)01-0033-03

清幽益胃灵由党参、白术、半夏、砂仁等多种中药组成, 具有健脾益胃扶正、清热解毒祛邪的功能, 为治疗幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori* HP) 阳性胃病的中药复方制剂, 根据中医辨证论治的原则, 该药在对抗HP菌的同时, 更注重整体调节, 有效提高机体的免疫功能, 促进胃粘膜损伤后的恢复, 改善HP菌赖以生存的胃部微环境。为进一步探讨清幽益胃灵的主要药效学机理, 为临床提供可靠依据, 我们做了以下实验研究。

1 抗菌实验

1.1 药品 清幽益胃灵, 山东中医药大学第二附属医院制剂室提供, 批号050306, 常法制备成水煎剂, 药物浓度1g/mL, 10磅15'灭菌备用。丽珠得乐, 批号050302, 丽珠集团丽珠制药厂生产。

1.2 菌株 幽门螺杆菌。由胃粘膜活检组织块中分离培养, 经生化鉴定证实为幽门螺杆菌, 比浊法调整菌液浓度为 10^8 /mL, 供抑菌试验用。培养基: 空肠弯曲菌琼脂基础, 上海市防疫站出品, 临用前加10%卵黄盐水, 万古霉素0.5mg/100mL, 多粘菌素B 0.38mg/100mL, 制成分离培养基。

1.3 方法 平皿二倍稀释法。受试药物用双倍浓度分离培养基作1:2稀释, 然后对倍稀释, 制成含药

平皿, 加菌液10 μ L, 37℃微氧环境培养3d, 观察有无细菌生长, 以无菌生长的最高药物稀释度为最低抑菌浓度。

1.4 结果 抗菌结果见表1。

表1 清幽益胃灵抗菌实验结果

菌号	药物浓度(g/mL)				菌液对照	药物对照	培养基对照
	0.5	0.25	0.125	0.0625			
1	—	—	+++	++++	++++	+	—
2	—	—	+	++++	++++	—	—
3	—	—	—	++++	++++	+	—
4	—	—	++++	++++	++++	+	—
5	—	—	++	++++	++++	++	—

注: “—”为无细菌生长, “++++~+”为细菌生长状况。

从表1可见, 清幽益胃灵在0.25g/mL时对全部菌株有抑菌作用, 个别较敏感菌株在0.125g/mL时仍可受到抑制, 对照组少数菌株受到抑制。

2 免疫功能实验

2.1 药品 同上。

2.2 动物 昆明种小鼠, 体重 20 ± 2 g, 雌雄各半, 购自山东医科大学动物中心。

2.3 仪器 日本产SMZ-140NZTG型体视显微镜。

2.4 试剂 肝素-Hank's液、蛋白胨水、5%鸡红细胞Asever's液。

2.5 方法 将小鼠随机分为5组, 每组10只, 雌雄各半, 分别为(1)正常对照组; (2)阳性对照组(2g/kg); (3)清幽益胃灵大剂量组(1g/kg); (4)中剂量组(0.5g/kg); (5)小剂量组(0.2g/kg), 分别以灌胃法给

[收稿日期] 2005-01-04

[基金项目] 济南市科委资助项目(No: 9874)

[通讯作者] 刘维明, Tel: (0531) 86690426; E-mail: wmmliu163@

sina.com

予生理盐水和药物,每日一次,连续 6d。第 4 次给药后 2h,腹腔注射蛋白胨水 1mL,末次给药后 2h,腹腔注射 5% 鸡红细胞悬液 0.5mL,间隔 4h 注入肝素-Hanks 液,立即脱颈椎白处死,轻揉腹部,开腹取腹腔液制片 2 张,甲醇固定,瑞氏染色,显微镜下计数 200 个巨噬细胞,分别计算吞噬百分率和吞噬指数(计算公式:吞噬百分率=吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/200 个巨噬细胞 × 100%,吞噬指数=被吞噬的鸡红细胞数/200 个巨噬细胞 × 100%)。

2.2 结果 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数结果见表 2。

表 2 清幽益胃灵对小鼠吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	吞噬百分率	吞噬指数
正常对照组	34.55 ± 5.09	0.61 ± 0.16
阳性对照组	57.45 ± 12.02 ³⁾	1.73 ± 0.23 ³⁾
大剂量组	60.10 ± 8.86 ³⁾	1.74 ± 0.43 ³⁾
中剂量组	55.80 ± 7.24 ³⁾	1.22 ± 0.30 ³⁾
小剂量组	39.50 ± 4.22 ¹⁾	0.87 ± 0.20 ²⁾

注:与对照组比: ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.005。

结果表明,受试药物清幽益胃灵大、中、小剂量组吞噬百分率(分别为 60.10 ± 8.86、55.8 ± 7.23、39.50 ± 4.22,吞噬指数($\bar{x} \pm s$)分别为 1.22 ± 0.30、1.74 ± 0.42、0.87 ± 0.20,均高于正常对照组。与对照组相比, P < 0.05, P < 0.005,有显著性差异和非常显著性差异,说明三个剂量组均能明显增强巨噬细胞的吞噬功能。

3 ¹⁴C-尿素呼气实验(¹⁴C-UBT)、透射电镜和扫描电镜观察

3.1 ¹⁴C-尿素呼气实验(¹⁴C-UBT)^[1,2]

3.1.1 药品 同上。

3.1.2 仪器 ¹⁴C-UBT 检测仪,深圳市中核海得威生物科技有限公司制造。

3.1.3 方法 选择病人,治疗组 100 例,对照组 60 例,嘱病人清晨空腹或餐后 2h,用 20mL 凉开水送服 ¹⁴C-UBT 检测胶囊 1 粒,静坐 25min 后,向 CO₂ 吸收剂中吹气 3min,检测吹气后的样品。

HP 感染度分级 ¹⁴C-UBT (dpm/mmol CO₂) < 120 (--) ; > 120 (+) ; > 300 (++) ; > 500 (+++) 。

3.1.4 结果 见表 3。

由表 3 分析,两组均有明显抑杀 HP 菌作用,经

统计学处理, P < 0.05,有显著性差异,治疗组对幽门螺杆菌的抑杀作用优于对照组。

表 3 两组治疗前后 ¹⁴C-尿素呼气实验比较(例)

组别	治疗组(n=100)				对照组(n=60)			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
治疗前	0	52	33	15	0	31	20	9
治疗后	83	13	4	0	35	17	8	0

3.2 透射电镜观察

送材:常规人体胃镜检查,并于胃窦及胃体行胃粘膜活检,治疗前 10 份,治疗后 10 份,共计 20 份标本。

切片及电镜观察方法:按常规用 4% 戊二醛及 1% 锇酸固定,乙醇梯度脱水,用 812 树脂包埋、切片,用 JEM-1200EX 电镜观察。

结果:治疗前胃组织细胞浆内线粒体嵴损伤程度不一,严重时呈空泡化。胞浆内空泡增多,细胞核内染色质有的减少,有的趋边化,细胞微绒毛短粗,数量减少,出现多胶元纤维。细胞间隙可见到幽门螺杆菌。治疗后胃组织细胞浆内线粒体多数形态完整,线粒体嵴损伤较少,胞浆内空泡数量较少,细胞微绒毛较长。细胞间隙的幽门螺杆菌有的细胞壁不完整,菌体内电子密度降低。

3.3 扫描电镜观察

送材:胃镜活检标本,治疗前 10 份,治疗后 10 份,共计 20 份标本。

制样方法:按常规用 4% 戊二醛及 1% 锇酸双固定后,乙醇梯度脱水,CO₂ 临界点干燥器干燥。用离子溅射仪喷金,用 JSM-35C 电镜观察。

结果:治疗前:细胞微绒毛粗短,数量较少,从外观看,细胞膜损伤较为严重,细胞间隙内有大量幽门螺杆菌,呈弯曲状聚集于凹隙内。治疗后:细胞微绒毛排列较为整体,微绒毛较细长。细胞膜损伤少见,细胞间隙内幽门螺杆菌不易见到。

4 急性毒性试验

4.1 药物 同上。

动物:健康昆明种小鼠,体重 20g ± 2g,雌雄各半,购自山东医科大学动物中心。

4.2 方法 半数致死量(LD₅₀)的测定:预备试验以小鼠每组 6 只,雌雄各半,共 3 组。供试药物分大、

中、小三个剂量组,蒸馏水配制,浓度分别为含生药 0.33g/mL、0.166g/mL、0.1g/mL, 每组分别给予不同浓度的药液灌胃, 每只鼠 0.7mL, 每日一次, 观察动物情况, 连续 7d。结果: 三组动物均无死亡, 活动、进食、毛色未见异常, 动物无死亡组, 未能测出受试动物的 LD₅₀。

最大耐受量的测定: 小鼠 20 只, 体重 20 ± 2g, 雌雄各半, 用大剂量组药物浓度 0.33g/mL 灌胃, 每只鼠 0.7mL, 每日一次。试验前 12h 禁食不禁水, 每日观察, 并记录动物反应情况, 连续观察 7d。结果: 动物无死亡, 活动、进食、毛色等未见异常, 体重略有增加。

4.3 结果 昆明种小鼠经灌胃途径给药, 给药量达 11.655g/kg, 受试动物无死亡, 经计算相当临床用药的 116.5 倍, 表明受试动物清幽益胃灵无明显毒副作用, 口服安全可靠。

5 讨论

幽门螺杆菌(HP)感染是导致慢性胃炎及消化性溃疡甚至胃癌发生的重要因素, HP 通过损害胃粘膜屏障并释放毒素和炎性介质, 形成胃及十二指肠的一系列病理改变^[3,4]。据统计, 在我国无症状人群中 HP 感染率为 65.42%, 而在胃病患者中更高达 80%~90%^[5], 感染清除后可明显减少或消除胃病的复发^[6]。对 HP 的治疗, 现代医学公认以铋剂为中心的药物治疗联合应用, 虽疗效确切, 但存在病人依从性低, 易产生细菌耐药, 抗生素相关结肠炎等副作用^[7], 结合多年临床经验, 我们从祖国医学整体观念出发, 认为本虚标实是 HP 阳性胃病的基本病机, 实邪感染为其标, 脾胃虚弱为其本, 以健脾益胃扶正, 清热解毒祛邪为其治疗大法研制的清幽益胃灵片正是本此思路而立。

清幽益胃灵由党参、白术、半夏、砂仁、黄芩、黄连、公英组成。方中党参、白术为君, 党参性甘平, 入脾肺经, 为健脾益胃佳品, 健脾运而不燥, 滋胃阴而不湿, 鼓舞清阳, 振动中气; 白术苦温, 归脾胃经, 和中补气, 除湿益燥, 两药合用, 加强健脾益胃之力, 培补中土, 根本可固。半夏、砂仁共为臣, 半夏性辛温, 入脾胃肺经, 为燥湿和胃之要药; 砂仁属化湿行气之品, 二者并用, 共凑燥湿和胃行气之功, 使其补而不

滞, 枢机运转, 气血可平, 升降可顺。黄连、黄芩、公英为佐药, 黄连苦寒, 可去中焦湿热, 并具解毒作用; 黄芩善清热燥湿, 泻火解毒; 公英为清热解毒利湿之品, 现代药理研究证实, 上三味药均有极强抗幽门螺杆菌作用, 三药合用, 清热解毒、苦寒降泄、驱邪外出。诸药相伍, 寒温并用, 苦降辛开, 补而不滞, 标本兼顾, 如此邪去正复, 诸症悉平。

药理实验证实, 清幽益胃灵在药物浓度为 0.25g/mL 时, 抗实验菌株作用明显, 其大、中、小剂量组均能明显提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 有提高免疫功能的作用。通过对胃粘膜超微结构的电镜扫描发现治疗前粘膜细胞损伤严重, 微绒毛粗糙, 数量减少, 治疗后细胞损伤已基本恢复, 微绒毛细长, 排列整齐。透射电镜亦观察到清幽益胃灵对幽门螺杆菌的细胞壁有明显破坏作用, 该药经急性毒性试验证实, 无明显毒副作用。综上所述, 清幽益胃灵片在抗菌的同时, 通过改善胃粘膜微环境, 提高机体免疫力, 增强组织修复能力, 改善 HP 赖以生存的条件, 从而达到促进 HP 阳性胃病痊愈的目的。由于其无毒副作用, 进而避免了铋剂及抗生素导致的菌群失调、胃肠道反应及耐药等副作用的发生, 这些都可能是该药发挥临床疗效的药理学依据。

[参考文献]

- [1] Marshall BJ, Surveyor I. Carbonyl 14 urea breath test for the diagnosis of campylobacter pylori associated gastritis [J]. J Nucl Med, 1988, 29, 29: 11.
- [2] Graham KS, Graham DY. H Pylori associated gastrointestinal diseases Handbooks in Health Care Co [J]. Aewtown, Ponsylvania, Usa 1998. 101.
- [3] 王继德. 幽门螺杆菌的致病机制[J]. 国外医学消化分册, 1995, 11: 25.
- [4] 陈敏章, 胡伏莲, 周殿元, 等. 幽门螺杆菌感染的基础与临床[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1977. 58.
- [5] 首届西太平洋幽门螺杆菌国际会议纪要[J]. 中华内科杂志, 1996, 35(7): 489.
- [6] 中华医学会第二届全国幽门螺杆菌专题学术研讨会纪要[J]. 中华消化杂志, 1995, 17(15): 287.
- [7] 贾博琦. 胃十二指肠溃疡病史幽门螺杆菌感染的治疗[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(5): 353.