

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2013.07.004

萎胃颗粒对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜核因子- κ B 和 内源性抑制因子表达的影响

黄 彬¹, 谢伟昌², 李 健¹, 黄明河¹, 郭绍举¹, 冯春霞¹

(¹ 深圳中医院 消化内科, 广东 深圳 518033;

² 广州中医药大学 2011 级研究生, 广东 广州 510405)

摘要:[目的]探讨萎胃颗粒对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠核因子(NF)- κ B 及其内源性抑制因子(I κ B α)表达的影响,进一步明确其作用机制。[方法]采用综合法复制大鼠 CAG 模型,造模成功后随机分为正常组、模型组及萎胃颗粒低、中、高剂量组,每组 10 只,观察萎胃颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜 NF- κ B 和 I κ B α 表达的影响。[结果]NF- κ B 蛋白 NF- κ BOD 值正常组为 0.116 ± 0.033 ,模型组 0.183 ± 0.035 ,萎胃颗粒低剂量组 0.158 ± 0.031 ,中剂量组 0.144 ± 0.039 ,高剂量组 0.126 ± 0.036 。与模型组比较,萎胃颗粒各治疗组 NF- κ BOD 值均有明显下降($P < 0.01$),且这种作用呈剂量依赖性:低剂量组 $>$ 中剂量组 $>$ 高剂量组,3 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。I κ B α 蛋白 OD 值正常组为 4.25 ± 1.02 ,模型组为 2.08 ± 0.74 ,萎胃颗粒低剂量组 2.77 ± 0.78 ,中剂量组 3.46 ± 0.84 ,高剂量组 4.12 ± 0.96 。与模型组比较,萎胃颗粒各治疗组 I κ B α OD 值均有明显的升高($P < 0.01$),且这种作用呈剂量依赖性:低剂量组 $<$ 中剂量组 $<$ 高剂量组,3 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。[结论]萎胃颗粒可能通过增加 CAG 大鼠胃黏膜 I κ B α 的表达,促进 I κ B α 与 NF- κ B 结合,进而抑制 NF- κ B 的活化,降低胃黏膜炎症程度,从而有效抑制胃黏膜的增生,避免 CAG 进一步向胃癌转化。

关键词:萎胃颗粒; 胃炎,慢性萎缩性; 核因子- κ B; 内源性抑制因子

中图分类号:R 573.3

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2013)07-0349-04

Effects of Weiwei granule on NF- κ B and I κ B α expressions in gastric mucosa of chronic atrophic gastritis rats

HUANG Bin¹, XIE Wei-chang², LI Jian¹, HUANG Ming-he¹, GUO Shao-ju¹, FENG Chun-xia¹

(¹ Digestive Department of Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China;

² Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract:[Objective]To explore the effects of Weiwei granule on NF- κ B and endogenous I κ B α expressions in gastric mucosa of chronic atrophic gastritis (CAG) rats and further investigate the mechanisms. [Methods]With the comprehensive methods, the rat models of CAG were established and assigned into normal group, modeling group and Weiwei granule groups with low, middle and high doses, and the effects of Weiwei granule on NF- κ B and I κ B α expressions in gastric mucosa of CAG rats were observed. [Results]The OD values of NF- κ B protein were 0.116 ± 0.033 in the normal group, 0.183 ± 0.035 in the modeling group, 0.158 ± 0.031 in the low-dose Weiwei granule group, 0.144 ± 0.039 in the middle-dose Weiwei granule group and 0.126 ± 0.036 in the high-dose Weiwei granule group. Compared with that in the modeling group, the OD values in all the Weiwei granule groups were obviously decreased ($P < 0.01$), which had the tendency of dosage-dependency, namely, low-dose group showed the highest NF- κ B expression and high-dose group showed the lowest NF- κ B expression, with significant difference among the three groups ($P < 0.01$); The OD values of I κ B α protein were 4.25 ± 1.02 in the normal group, 2.08 ± 0.74 in the modeling

收稿日期:2013-04-20

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031700043)

作者简介:黄 彬,男,主任医师,从事中医药治疗消化内科疾病的临床研究

group, 2.77 ± 0.78 in the low-dose Weiwei granule group, 3.46 ± 0.84 in the middle-dose Weiwei granule group and 4.12 ± 0.96 in the high-dose Weiwei granule group. Compared with that in the modeling group, the OD values in all the Weiwei granule groups were apparently increased ($P < 0.01$), which also had the tendency of dosage-dependency, with significant difference among the three groups ($P < 0.01$). [Conclusion] Weiwei granule might up-regulate the $I\kappa B\alpha$ expression in the gastric mucosa of CAG rats, promote the integration of $I\kappa B\alpha$ and $NF-\kappa B$ and inhibit the activation of $NF-\kappa B$, hence lowering the inflammation of gastric mucosa, effectively inhibiting the hyperplasia of gastric mucosa and preventing the CAG further transformation into gastric carcinoma.

Key words: Weiwei granule; chronic atrophic gastritis; $NF-\kappa B$; $I\kappa B\alpha$

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是一种表现为胃黏膜上皮和腺体萎缩、黏膜变薄、黏膜肌层增厚及伴有肠腺化生、不典型增生为特征的慢性胃炎,是消化系统的常见病和难治病。萎胃颗粒是我院脾胃专科在总结多年诊治 CAG 经验基础上,吸取国内外近年来 CAG 治疗成果,挖掘与发挥中医药在本病治疗上的优势研制的专门用于治疗 CAG 的中药制剂,该药已在我院临床应用多年,具有明显的临床效果。本研究旨在通过对大鼠 CAG 动物模型,拟从实验角度观察萎胃颗粒治疗 CAG 的作用机制。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 50 只 8 周龄 SD 大鼠,体重 $180 \sim 220$ g,采用架式笼养,恒温(20 ± 2) $^{\circ}C$,湿度 $50\% \sim 60\%$,光照、黑暗各 12 h 交替,通风循环良好。实验大鼠购自南方医科大学南方医院实验动物研究所。

1.1.2 药物与试剂 萎胃颗粒由深圳中医院提供,为中药提取物加糖粉及糊精制成,获得广东省院内制剂批准文号(粤 Z20070548),每袋 10 g,相当于生药黄芪 15 g,党参 15 g,白术 7.5 g,白花蛇舌草 7.5 g,黄精 7.5 g,枸杞子 7.5 g,莪术 5 g,三棱 5 g,麦冬 7.5 g,石斛 7.5 g,半枝莲 7.5 g,三七 5 g。核因子(NF)- κB 、内源性抑制因子($I\kappa B\alpha$)抗体购自 Bioworld;柠檬酸盐缓冲液、山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体、抗体稀释液购自中杉金桥;DAB 浓缩加强型试剂盒购自广州深达生物。

1.2 方法

1.2.1 造模 CAG 模型制作参考文献中常用的方法^[1-3],1~5 周自由饮用 20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液,第 6~13 周,分别自由饮用 20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液和 15%乙醇,每隔 3 天轮换 1 次;同时前 5 周每 5 天,后 8 周每 7 天用水浴恒温 $55^{\circ}C$ 的 60%乙醇按 10 ml/kg 剂量给予灌胃;另外配合饥饿失常

法,即 1~8 周 2 天饱食,1 天禁食;9~13 周 2 天饱食,1 天禁食水。

1.2.2 实验分组及用药 正常组($n=10$)自由饮食;剩余大鼠($n=40$)均行造模,23 周末造模结束,随机分为 4 组,每组 10 只,模型组每日用自来水按 10 ml/kg 灌胃,萎胃颗粒剂高、中、低剂量组分别按等效剂量人日用量 $\times 0.018 \times 5$ 的 4:2:1 倍设置。12 周后处死大鼠,取胃黏膜组织制作切片。

1.2.3 胃黏膜 $NF-\kappa B$ 、 $I\kappa B\alpha$ 蛋白的表达 免疫组织化学法检测,严格按试剂盒方法操作,检测结果以平均光密度表示,在相同的高倍镜(10×40)下,每张免疫组化切片随机选择 5 个胃黏膜视野,用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测其平均光密度,以其 5 个视野的均数作为每张切片 $NF-\kappa B$ 、 $I\kappa B\alpha$ 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件处理,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

正常组大鼠被毛光泽,唇色、尾色淡红,大便颗粒状;模型组大鼠被毛松散无光泽,唇色、尾色苍白,食量较正常组少,部分大鼠出现腹泻以及拉尾现象。造模结束时体质差异不显著,各组大鼠无伤亡发生。

2.2 各组大鼠胃黏膜病理变化

肉眼观察可见正常组大鼠胃黏膜表面光滑,色泽淡红,黏膜皱襞正常;模型组大鼠胃黏膜充血并有散在出血点,局部黏膜淡白,皱襞走向紊乱;各药物治疗组大鼠胃黏膜整体炎症程度较模型组减轻,腺体数量明显增多。

2.3 各组胃黏膜组织 $NF-\kappa B$ 蛋白的表达

$NF-\kappa B$ 蛋白在细胞核内表达,细胞核出现棕色或棕黄色为阳性表达细胞; $NF-\kappa B$ 蛋白 OD 值正常组为 0.116 ± 0.033 ,模型组 0.183 ± 0.035 ,萎胃颗粒低剂量组 0.158 ± 0.031 ,中剂量组 $0.144 \pm$

0.039,高剂量组 0.126 ± 0.036 。与模型组比较,萎胃颗粒各治疗组 OD 值均有明显下降 ($P < 0.01$),且这种作用呈剂量依赖性:低剂量组 $>$ 中剂量组 $>$ 高剂量组,3 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$);结果见图 1。

2.4 各组胃黏膜组织 I κ B α 蛋白表达的比较

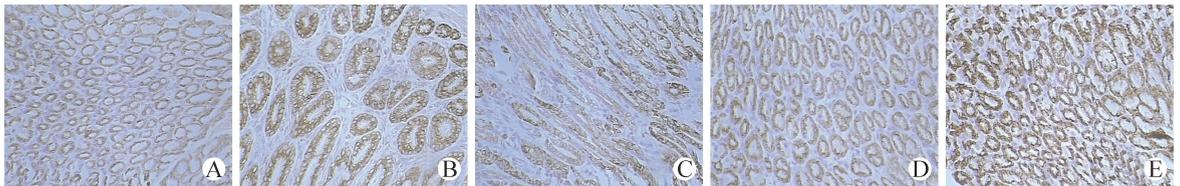
I κ B α 蛋白在细胞质内表达,细胞质出现棕色或棕黄色为阳性表达细胞;I κ B α 蛋白 OD 值正常组为 4.25 ± 1.02 ,模型组为 2.08 ± 0.74 ,萎胃颗粒低剂量组 2.77 ± 0.78 ,中剂量组 3.46 ± 0.84 ,高剂量组 4.12 ± 0.96 。与模型组比较:萎胃颗粒各治疗组 OD 值均有明显的升高 ($P < 0.01$),且这种作用呈剂量依赖性:低剂量组 $<$ 中剂量组 $<$ 高剂量组,3 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),结果见图 2。

3 讨论

目前,轻、中度 CAG 的治疗西医主要采用抗幽门螺杆菌(Hp)、胃黏膜保护剂、补充维生素 B12、叶酸及胃酸等方法治疗,重度者多以手术和随访为主,虽然能够改善 CAG 的一些症状,但对于逆转胃黏膜萎缩,特别是伴有肠腺化生或不典型增生的病理改变,缺乏特异性、公认有效的治疗措施。近年来,在国内传统医学工作者的共同努力下,CAG 的中医治疗方面取得了卓越的成效。CAG 临床上以胃脘痞满、疼痛和食欲不振为主症,以嗝气、嘈杂、乏力等为次症,故中医学将其归属于“胃痞”“胃脘痛”“嘈杂”等范畴。CAG 病因复杂,多由外邪犯胃,饮食失调,情志内伤或体质虚弱等原因所致。病变脏腑在胃腑,肝、脾在病机中起重要作用,胆与肾也与之相关。临床观察发现,虚、瘀、毒是其核心病机,病程日久,多表现为虚实夹杂,本虚标实之象,因此其治疗

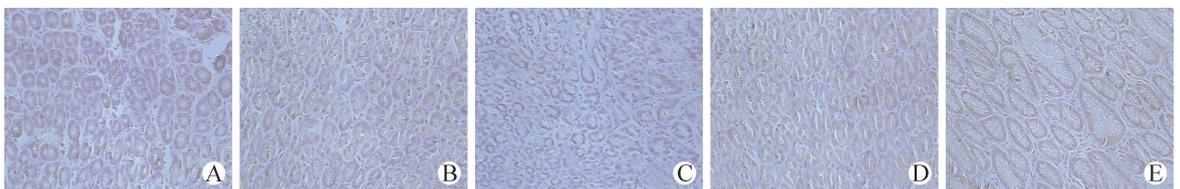
需标本兼治为宜。萎胃颗粒以益气健脾、养阴活血、清热解毒为组方原则,方以黄芪、党参、炒白术补气健脾;黄精、枸杞子、麦冬、石斛养阴益胃,有增加胃酸的作用,恢复脾胃纳运、升降、化生功能;莪术、三棱、田七活血通络,使脾胃脉络通畅、瘀滞消除,胃腑得以滋溉,利于萎缩病变的改善;白花蛇舌草、半枝莲清热祛毒,使其久病久积导致的湿热郁毒得以清除,有助于胃黏膜的新陈代谢及利于黏膜病变的恢复。该方药以益气健脾、养阴活血为主,兼以清胃热祛瘀毒,标本兼治,虚实共调,恰中 CAG 病机,故获良效^[4-5]。

NF- κ B 是近年发现的核因子家族中的新成员,广泛存在于多种组织细胞中,激活后参与多种基因的表达和调控,在炎症、免疫、氧化应激、细胞增殖、细胞凋亡等生理病理过程中发挥作用,是细胞内最重要的核转录因子。在正常情况下,无活性的 NF- κ B 大多以 p65-p50-I κ B 聚体的形式存在于细胞质中,其中 I κ B 为抑制性亚单位,在刺激剂(如 LPS、TNF- α 等)作用下,I κ B 磷酸化降解,激活的 NF- κ B 迅速移入细胞核,与靶基因上启动了区域的 κ B 序列发生特异性结合,启动相应基因转录和蛋白质表达^[7],从而高效诱导多种细胞因子、黏附分子和急性期反应蛋白的表达,后者又进一步活化 NF- κ B,并形成正反馈调节,使炎症不断放大。NF- κ B 的内源性抑制因子主要是 I κ B 抑制蛋白家族,而 I κ B α 是 I κ B 家族中研究最早且相对清楚的一员,参与 NF- κ B 的负反馈调节^[8]。I κ B α 的氨基末端含有 1 个核移出信号(NES),第 2 个锚蛋白重复序列内含 1 个核移出信号序列(NIS)。在 NES 和 NIS 的辅助下,I κ B α 可连续在核浆之间穿梭,因 I κ B α 与 NF- κ B 之



A: 正常组;B: 模型组;C: 低剂量组;D: 中剂量组;E: 高剂量组

图 1 各组胃黏膜组织 NF- κ B 免疫组化结果($\times 400$)



A: 正常组;B: 模型组;C: 低剂量组;D: 中剂量组;E: 高剂量组

图 2 各组胃黏膜组织 I κ B α 免疫组化结果($\times 400$)

间有更强的亲合力,可以促使 NF- κ B 从已结合的 DNA 上解离下来,从而将大量入核、已活化的 NF- κ B 再次带回细胞质,避免 NF- κ B 过度活化,以负反馈的形式调节 NF- κ B 的活性^[9]。I κ B α /NF- κ B 通路是炎症反应的重要环节,且与肿瘤的发生有关。在炎症相关的肿瘤动物模型里^[10],依赖于 I κ B 激酶 (I κ B kinase β , I κ BK β)通路的 NF- κ B 活化是炎症致肿瘤的关键。胃癌是最常见恶性肿瘤之一,而 CAG 发展变化是胃癌演变过程中的关键环节。本实验旨在通过制造大鼠动物模型,研究姜胃颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜 NF- κ B 和 I κ B α 表达的影响,以进一步明确姜胃颗粒的作用机制。结果发现,NF- κ B 蛋白表达:模型组 NF- κ B 蛋白 OD 值明显高于正常组,姜胃颗粒各治疗组 NF- κ B 蛋白 OD 值明显低于模型组($P < 0.01$),且这种作用呈剂量依赖性:低剂量组 > 中剂量组 > 高剂量组,3 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。I κ B α 蛋白表达:模型组 I κ B α 蛋白 OD 值明显低于正常组,姜胃颗粒各治疗组 I κ B α 蛋白 OD 值明显高于模型组($P < 0.01$),且这种作用呈剂量依赖性:低剂量组 < 中剂量组 < 高剂量组,3 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。根据以上研究结果,我们认为姜胃颗粒可能通过增加 CAG 大鼠胃黏膜 I κ B α 的表达,促进 I κ B α 与 NF- κ B 的结合,进而抑制 NF- κ B 的活化,降低了胃黏膜炎症程度,从而有效抑制胃黏膜的增生,避免 CAG 进一步向胃癌转化。

参考文献

[1] 邓伟民,许鑫梅. 清胀冲剂治疗大鼠慢性萎缩性胃炎

实验研究[J]. 广州中医药大学学报,1998,15(3): 200-201.

- [2] 王茵萍,范刚启,孙茂峰,等. 穴注黄芪,当归注射液对实验性慢性萎缩性胃炎胃粘膜屏障的影响[J]. 广州中医药大学学报,2002,19(3): 195-198.
- [3] 翦林宏,彭志辉,陈立峰,等. 大鼠慢性萎缩性胃炎模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(3): 161-163.
- [4] 蔡锦莲,黄明河,陈秀凤,等. 姜胃散治疗慢性萎缩性胃炎及癌前病变的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2002,10(1):14-17.
- [5] 蔡锦莲,李爱娣,曾兰英. 姜胃散治疗慢性萎缩性胃炎临床研究[J]. 河南中医,2006,26(5):28-30.
- [6] 黄明河,蔡锦莲. 姜胃散治疗大鼠慢性萎缩性胃炎实验研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志,2000,8(4):199-200.
- [7] GHOSH S, KAIN M. Missing peeces in the NF-kap-paB puzzle [J]. Cell,2002,109 (Suppl): S81-96.
- [8] LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2001,2:589-598[PMID:11483992].
- [9] LI Z W, CHU W, HU Y, et al. The IKKbeta subunit of I kappaB kinase (IKK) is essential for nuelear Faector kappaB aetivation and prevention of apoptosis[J]. J Exp Med, 1999,189: 1839-1845.
- [10] KIDO M, TANAKA J, AOKI N, et al. Helicobacter pylori promotes the production of thymic stromal lymphopoietin by gastric epithelial cells and induces dendritic cell-mediated inflammatory Th2 responses[J]. Infect Immun,2010,78: 108-114.

作者网上注册须知

(1)对第一次使用本刊网络系统进行投稿的作者,必须先注册,才能投稿。在注册时,作者自己设定用户名和密码。该用户名和密码终生有效。

(2)对曾经注册过的作者,请务必不要重复注册,否则将导致查询稿件时,信息不完整。如果遗忘密码,可以从系统自动获取,系统将自动把您的帐号信息发送到您注册时填写的邮箱中。

(3)注册时,各项信息请填写完整。

《中国中西医结合消化杂志》编辑部