论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1928-04

自制方化湿液对湿阻证大鼠胃黏膜的保护作用及对表皮生长因子受体表达的影响

薛晓倩[1],黄学宽[1],高 宁[2],刘鄂湖[2] (401331 重庆,重庆医科大学中医药学院[1];400038 重庆,第三军医大学药学院生药学教研室[2])

[摘要] **目的** 研究自制方化湿液对湿阻证大鼠胃黏膜保护作用及对表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor,EGFR)表达的影响。**方法** 将40只SD大鼠分为正常组,模型组,化湿液低、中、高剂量组,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6 d。造模成功后正常组和模型组予生理盐水灌胃,化湿液治疗组按低、中、高剂量(4、8、16 g/kg)灌胃治疗,每天1次,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,且血清MT及GSH-Px含量降低[MT:(9.68±1.48),GSH-Px:(368.10±52.92),$P<0.05$],MDA含量增高[(19.43±3.49),$P<0.05$];免疫组化显示,模型组大鼠胃黏膜EGFR表达较正常组减少[灰度值(166.013±7.757),光密度值(0.025±0.193),$P<0.05$]。经化湿液治疗后,与模型组比较,血清MT及GSH-Px含量增高($P<0.05$),MDA含量降低($P<0.05$),大鼠胃黏膜EGFR表达依次增加($P<0.05$)。**结论** 自制方化湿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] 化湿液;湿阻证;胃黏膜;表皮生长因子受体;自由基损伤
[中图法分类号] R285.5;R289.5;R322.44 [文献标志码] A

Protective effect of dampness-releasing liquid on gastric mucosa and expression of epithelial growth factor receptor in rats with dampness retention syndrome

Xue Xiaoqian[1], Huang Xuekuan[1], Gao Ning[2], Liu Ehu[2]([1]College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 401331; [2]College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the protective effect of dampness-releasing liquid on gastric mucosa and expression of epithelial growth factor receptor (EGFR) in rats with dampness retention syndrome (DRS). **Methods** Forty SD rats were randomly divided into control group, model group, and low, medium and high dampness-releasing liquid dose groups (8 in each group). Rats in control group were fed with routine rat chow. A DRS model was induced by modifying the environment and increasing fatigue in the other groups for 6 d. Then, rats in control and model groups received intra-gastric normal saline (NS), while those in low, medium and high dampness-releasing liquid dose groups received dampness-releasing liquid at the dose of 4 g/kg,8 g/kg and 16 g/kg respectively, once a day for 8 d. Serum melatonin (MT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) levels were measured by colorimetry and expression of EGFR was detected by immunohistochemistry in different groups. **Results** The symptoms of spleen insufficiency, hyperemia and edema in gastric mucosa with hemorrhagic spots and clots were more significant in model group than in control group ($P<0.05$). The serum levels of MT and GSH-Px were lower and that of MDA was higher in model group than in control group after treatment with dampness-releasing liquid (9.68±1.48, 368.10±52.92, 19.43±3.49, $P<0.05$). Immunohistochemistry showed that the expression level of EGFR in gastric mucosa was lower and the OD value was significantly higher, while the serum levels of MT and GSH-Px were higher and that of MDA was lower in model group than in control group after treatment with dampness-releasing liquid (166.013±7.757, 0.025±0.193, $P<0.05$). **Conclusion** Dampness-releasing liquid can significantly improve the symptoms of spleen insufficiency and protect gastric mucosa against injury by increasing the anti-oxidative

[基金项目] 重庆市卫生局科技项目(2009-2-143)
[通信作者] 黄学宽,E-mail:xkhuang2002@163.com

capacity and expression of EGFR in gastric mucosa.

[**Key words**] dampness-releasing liquid; dampness retention syndrome; gastric mucosa; epithelial growth factor receptor; free radical damage

Supported by the Science and Technology Project of Chongqing Municipal Health Brueau (2009-2-143). Corresponding author: Huang Xuekuan, E-mail: xkhuang2002@163.com

湿阻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]。当脾胃损伤后,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(maleicdialdehyde,MDA)含量可以了解机体自由基的产生,而血清褪黑素(melatonin,MT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)的含量则可反应机体抗氧化系统的功能状态[2-3]。表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor,EGFR)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]。化湿液是全国名老中医、重庆医科大学附属第二医院王辉武教授经过几十年临床验证总结出来的经验方,由藿香、白豆蔻、白术、茯苓、厚朴、防风、柴胡、山楂、丹参等中药组成,用于治疗急性胃肠炎、急性胆囊炎、急性肝炎等急症及病毒性感冒、慢性胃肠炎、脂肪肝、糖尿病等"湿证"疾病,疗效显著[5]。本研究探讨化湿液对湿阻证大鼠胃黏膜保护作用及EGFR表达的影响,旨在进一步说明化湿液对湿阻证的治疗作用,以期为化湿液的开发提供更多实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠(85~110 d龄)40只,雌雄各半,体质量(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

化湿液方中各味中药由重庆医科大学中医药学院提供并鉴定,按常规法自治煎剂,即冷水浸泡30 min,煮沸30 min,水煎3次,合并药液,浓缩为含生药2.0 g/ml。MT、GSH-Px及MDA试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;免疫组织化学(S-P)法试剂盒及EGFR一抗均由北京康维世纪生物科技有限公司提供。

1.3 主要实验仪器

切片机(LEZCARM2135),BMJ-Ⅲ型包埋机,BH-2型光学显微镜(日本Olympus),显微摄像仪(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。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组与造模 将40只SD大鼠适应性喂养1周后,分为正常组,模型组,化湿液低、中、高剂量组,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)℃,将大鼠放入深25 cm、(26±1)℃的水池中游泳15 min,游毕取出,立即给予4 ℃的蒸馏水(20 ml/kg)灌胃后将动物置于有4 mm水深的笼中饲养,自由进食与饮水。上述操作每天1次,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、大便、进食及体质量等情况。造模成功后,从第7天开始,正常组和模型组予生理盐水(20 ml/kg)灌胃,化湿液低、中、高剂量组(4、8、16 g/kg)分别按20 ml/kg灌胃治疗,每天1次,连续8 d[7]。

1.4.2 血清MT、GSH-Px、MDA检测 眼球采血3~5 ml,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MT、GSH-Px、MDA的含量。

1.4.3 胃黏膜EGFR蛋白表达 处死大鼠,摘取全胃并清洗,肉眼观察胃黏膜情况,并刮取胃黏膜组织,大小约0.5 cm×1.0 cm,置于4%多聚甲醛固定液中固定24 h。采用S-P法染色。切片常规脱蜡水化,柠檬酸缓冲液热修复。兔抗鼠单克隆抗体EGFR(按1∶100稀释)4 ℃孵育过夜。其他后续操作步骤按S-P试剂盒说明书进行。对照实验:空白对照用PBS替代一抗进行上述免疫组化反应。结果以细胞膜和细胞质内出现棕黄色颗粒为判定标准,按阳性区域表达由强至弱分为:强阳性(+++)、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光密度值,再求出平均值。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 17.0统计软件,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。

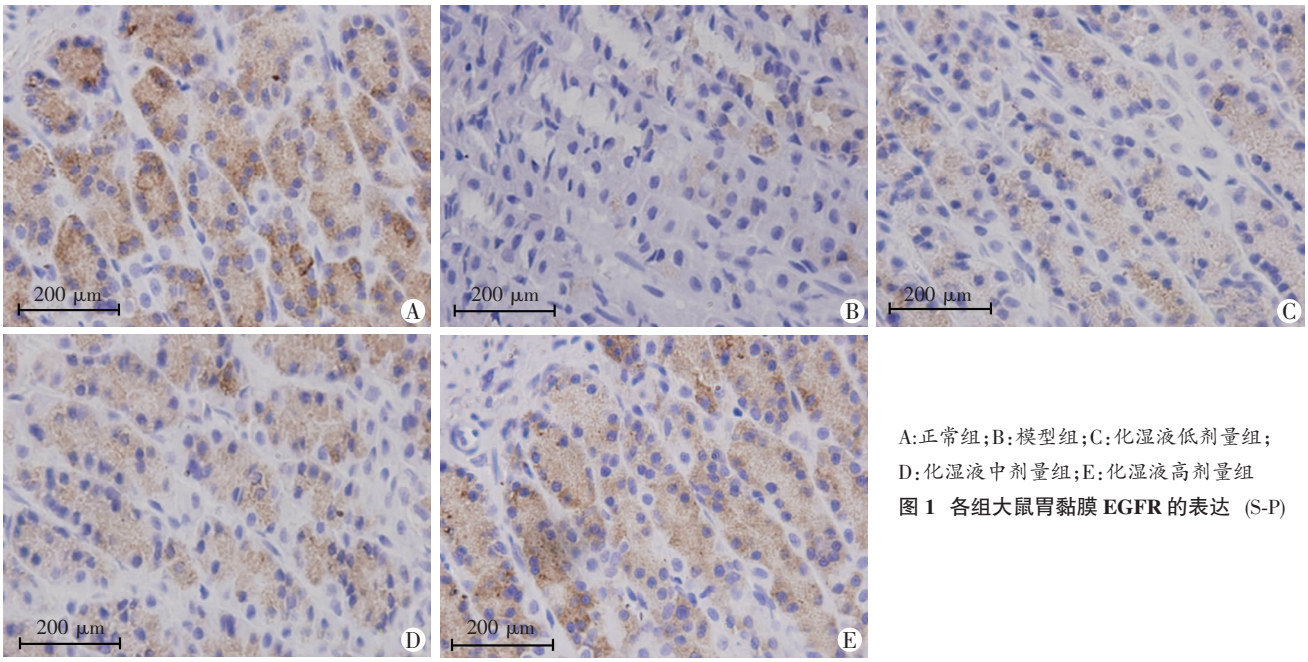
2 结果

2.1 大鼠一般情况及胃黏膜观察

与正常组相比,模型组大鼠精神萎靡、懒动,游泳坚持时间缩短、呛水时间早,便溏,脱毛,饮食量减少,体质量下降,胃黏膜充血、水肿明显,有小出血点及凝血块。经化湿液治疗后,大鼠体质量、饮食等一般情况均有明显改善,精神萎靡、倦怠乏力、便溏、脱毛等症状消失。损伤的胃黏膜得到修复,无充血、水肿、出血及凝血块等表现。

2.2 大鼠血清MT、GSH-Px、MDA含量

与正常组相比,模型组大鼠血清MDA含量增高($P<0.05$),MT、GSH-Px含量降低($P<0.05$)。与模型组比较,化湿液低、中、高剂量组大鼠血清MDA明显降低($P<0.05$),MT、GSH-Px含量有不同程度增加($P<0.05$)。见表1。



A:正常组;B:模型组;C:化湿液低剂量组;
D:化湿液中剂量组;E:化湿液高剂量组

图1 各组大鼠胃黏膜EGFR的表达 (S-P)

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

组别	MT (pg/ml)	GSH-Px (U/ml)	MDA(nmol/ml)
正常组	11.53±1.98	493.22±81.92	4.64±0.74
模型组	9.68±1.48[a]	368.10±52.92[a]	19.43±3.49[a]
化湿液低剂量组	11.35±2.17[ab]	460.31±86.04[ab]	8.42±1.56[ab]
化湿液中剂量组	11.42±1.36[ab]	463.54±74.49[ab]	7.92±1.17[ab]
化湿液高剂量组	11.44±1.73[ab]	466.78±71.78[ab]	7.64±1.95[ab]

a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

2.3 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,化湿液低、中、高剂量组胃黏膜EGFR表达均有不同程度增加,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($P<0.05$)。见表2,图1。

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

组别	阳性区域显色强度	灰度值	光密度值
正常组	+++	129.475±14.505	0.200±0.035
模型组	− ~ ±	166.013±7.757[a]	0.025±0.193[a]
化湿液低剂量组	+	154.863±3.603[ab]	0.088±0.413[ab]
化湿液中剂量组	+ ~ ++	148.525±7.726[ab]	0.113±0.200[ab]
化湿液高剂量组	++	141.713±9.583[ab]	0.146±0.054[ab]

a:$P<0.05$,与正常组比较; b:$P<0.05$,与模型组比较

3 讨论

《素问·至其要大论》提到:“诸湿肿满皆属于脾”,可见湿邪致病每易伤脾,脾失健运也易滋生内湿。化湿液方中之藿香、白蔻等化气分之湿,茯苓等利停留之湿,防风等驱外来之湿,白术等运内生之湿,柴胡等除肝郁之夹湿,山楂等化肥甘厚味之湿,厚朴等燥湿除寒。丹参等活血化瘀之品,既能直接改善水湿运行和代谢,又能清除淤血,诸药合用,彰显行气疏肝、健脾除湿、活血化瘀之功,共凑综合化湿之法[5]。现代药理研究证明,本方还具有增强免疫力、抗菌消炎、保肝、抗溃疡等药理作用[5]。湿阻证是指湿邪阻滞中焦,致气机失于宣畅,运化功能减弱引起以头重身困、脘痞胸闷、怠惰乏力、口干纳呆、苔腻脉濡为临床特征的病症[1]。以往对湿阻证的论治主要是芳香化湿、清热、利水、祛风、宣肺、健脾、温阳、益气等法[9]。本方独到之处则是除了运用各种除湿法外,还突出了活血化瘀、行气疏肝等在除湿方面的特殊作用。而湿阻证动物模型是中医药科研一个十分成熟的模型,如黄秀琛等[10-12]对湿阻证的研究。

现代研究证实,湿邪引起的胃肠消化、吸收及运动功能障碍为主的症候群与各种原因所导致的胃炎、胃溃疡等相似。胃镜表现为黏膜充血、水肿、糜烂或伴有出血点等急性炎症改变[5]。此时自由基可大量产生,从而进一步加重胃黏膜的损伤。MT是由松果体分泌的一种神经激素,是目前已知体内抗氧化作用最强的

自由基清除剂[2],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[13]。GSH-Px是重要的抗氧化酶系,有对抗自由基损伤和清除氧自由基、减少氧化物蓄积等作用[14],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,稳定细胞生物膜而发挥作用。故可将GSH-Px作为判断抗过氧化能力的重要指标[15]。MDA是脂质过氧化反应最终代谢产物,反映机体脂质过氧化的速度和强度,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增加,体内脂质过氧化的能力远大于抗氧化的能力。用化湿液治疗后,大鼠血清MDA含量降低,而血清MT与GSH-Px的含量明显增高,说明化湿液能通过增强大鼠机体抗氧化能力和抑制自由基的生成而对胃黏膜起保护作用。

胃黏膜上皮细胞及其黏液层是胃黏膜的重要保护屏障[16],其表面存在一层磷脂,具有疏水性,其疏水性变化可以导致胃黏膜完整性的改变[17]。EGFR属于跨膜受体酪氨酸蛋白激酶(tyrosine proteikinase,TPK)家族,主要集中在胃黏膜上皮胃腺颈区(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[4]。Wong等[18]研究发现在幽门螺杆菌所致的胃黏膜损伤中,EGFR表达增加,在幽门螺杆菌清除后则可恢复到正常水平,说明EGFR的上调能对损伤胃黏膜起修复作用。它可介导细胞的代谢、增殖、分化、黏附及迁延[19]。其修复主要在早期阶段30 min至2 h发挥作用[20]。本实验结果显示,模型组大鼠腹胀、纳少、体质量等脾虚症状明显,胃黏膜EGFR表达量显著降低,用化湿液治疗后,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表达也有不同程度升高。可以看出,化湿液改善湿阻证大鼠纳少、体质量减轻等症状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,化湿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。

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): 9-11.
[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): 613-615.
[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): 1108-1109.
[4] 钟艳, 严洁. 表皮生长因子受体与胃粘膜损伤修复的研究进展[J]. 中外健康文摘: 医药月刊, 2008, 5(5): 175-177.
[5] 黄学宽, 任凌燕. 化湿液组方原理及开发价值分析[J]. 实用中医药杂志, 2006, 22(9): 572-573.
[6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 第2版. 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粘膜损伤修复的影响[J]. 中药材, 2008, 31(12): 1849-1851.
[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): 566-567.
[9] 耿新民. 治湿证重在升脾宣肺[J]. 当代医学, 2009, 15(27): 152.
[10] 黄秀琛, 刘德芳, 陈洁, 等. 大鼠中焦湿阻证与抗利尿激素关系的实验研究[J]. 成都中医药大学学报, 2002, 25(1): 35, 37.
[11] 孙改侠, 黄秀深, 罗明凤, 等. 理中丸含药血清对中焦湿阻证Cajal间质细胞代谢作用的影响[J]. 吉林中医药, 2010, 30(4): 350-352.
[12] 邓利平, 黄秀深, 王良, 等. 平胃散对湿困中焦证模型水调激素的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2010, 33(6): 74-75.
[13] 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): 72-78.
[14] 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): 501-502.
[15] 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): 910-913.
[16] 付蕾, 姚春. 中医药对胆汁反流性胃炎胃黏膜的保护机制探讨[J]. 大众科技, 2011, (1): 100-101.
[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): 334-336.
[18] Wong B C, Wang W P, So W H, *et al*. Epidermal growth factor and its receptor in chronic active gastritis and gastroduodenal ulcer before and after Helicobacter pylori eradication[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2001, 15(9): 1459-1465.
[19] 林寿宁, 杨继波, 张建军. 表皮生长因子及其受体与胃溃疡愈合关系[M]. 山西中医, 2011, 27(3): 58-60.
[20] Syam A F, Sadikin M, Wanandi S I, *et al*. Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer[J]. Acta Med Indones, 2009, 41(2): 95-98.

(**收稿**:2011-04-18;**修回**:2011-05-29)
(编辑 王小宴)