维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0970-03

沙棘原花青素治疗慢性胃炎的机理及与细胞凋亡的相关性研究

黄国栋[1],杨治芳[1],游 宇[1],徐 龙[1],黄媛华[2],唐丽君[3]

(1、江西省南昌大学第一附属医院中西医结合科,南昌 330006;2、湖南中医药大学附属衡阳医院,衡阳 421001;
3、湖南省人民医院,长沙 410000)

【摘 要】目的:观察沙棘原花青素(Sea buckthorn procyanidins,SBPC)对幽门螺杆菌(Helicobacter pylori,Hp)相关性胃炎胃粘膜血小板活化因子(Platelet activating factor,PAF) 和 Midkine 基因(MK)表达的变化,并分析其可能的作用机制。方法:80 例幽门螺杆菌感染慢性胃炎患者随机分为 2 组,治疗组 42 例给予沙棘原花青素治疗,对照组 38 例给予西药三联药物治疗。应用胃镜下活检胃黏膜组织快速尿激酶和 Warthin-Starry 染色法检测幽门螺杆菌,应用免疫组化,Western blotting 检测 Midkine,血小板活化因子表达的变化。应用末端转移酶介导的 dUTP 切口末段标记法(TUNEL)检测凋亡小体。第 4 周复查胃镜。结果:治疗组总有效率为 88.1%高于对照组 78.9%($P<0.05$)。同时, 治疗组及对照组治疗后凋亡指数均有明显的下降, 组间有显著性差异($P<0.05$)。免疫组化,Western blotting 检测显示:沙棘原花青素可提高 MK 和下调 PAF 的表达,而对照组对胃黏膜 MK 和 PAF 的表达影响不大。结论:沙棘原花青素治疗本病机理可能与杀灭 HP 和提高 MK 和下调 PAF 的表达来抑制细胞凋亡有关。

【关键词】幽门螺杆菌;胃炎;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R286.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-27

Observe the possible mechanisims of sea buckthorn procyanidins (SBPC) Treat gastritis and study the relationship with apoptosis

HUANG Guo-dong, et al

(*Ward of Combine Traditional Chinese and Western Medicine, the First Affiliated Hospital of NanChang University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of sea buckthorn procyanidins(SBPC)on MK and platelet activating factor(PAF)in helicobacterpylori-associated gastritis and study the potentional mechanisim. *Methods*: 80 cases were randomized into two groups. 42 cases in the SBPC group which were given SBPC and 38 cases in the control group which were given three combined mecidine. TUNEL technique and immunohistochemistry were used to detect the apoptotic cells. Detection on Biospy Specimens of gastric mucosa was done.H.pylori was detected by urease test and Warthin-Starry method and To observe the effects of sea buckthorn procyanidins (SBPC)on the expressions of MK and platelet activating factor (PAF), which were observed by Immunohischemical and Western blotting method.All of the patients underwent gastroscopy at the 6th week. *Results*: The difference of apoptotic index between SBPC group and control group had great statistical significance, with the total efficience of SBPC higher than that of control group($P<0.05$), The Immunohischemical and Western blotting method showed that SBPC could reduce the gastic mucosa,s expression of PAF, elevate the expression of MK, but the Control Groups hadn't this kind of action. *Conclusion*: The results implied that the possible mechanisims of SBPC are to kill HP, reduce the gastic mucosa,s expression of PAF, and elevate the expression of MK to suppress apoptosis.

【Key words】 H. pylori; Gastric; Apoptosis

Hp 与慢性胃炎的发生和发展密切相关,但其致病机制仍未完全清楚。细胞凋亡属基因调控下的细胞自杀性死亡,是程序性细胞死亡的主要形式。大量报道认为:Hp 能诱导细胞凋亡,导致胃粘膜的完整性的破坏,从而产生或加重炎症或溃疡损伤[1]。近年来我们用沙棘原花青素治疗幽门螺杆菌相关

作者介绍:黄国栋(1974—),男,主治医师,博士,
研究方向:消化系统疾病和肛肠疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

性胃炎取得了满意疗效,本课题通过胃镜下活检胃黏膜组织应用快速尿激酶和 Warthin-Starry 染色法检测幽门螺杆菌,并同时检测 PAF、MK 的表达和采用 TUNEL 技术方法检测胃粘膜上皮细胞的凋亡,来探讨沙棘原花青素(JWYY)抗胃炎的作用机理。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择 2005 年 8 月 ~2006 年 9 月湖南省人民医院,湖南中医药大学附属衡阳医院内科住院病人及门诊病人。所有患者均因上消化道症状就诊,并在我院胃镜室行胃镜确诊为慢性胃炎,经 Hp 检测为阳性。所有患者在接受胃镜检查前 1 月内未服用糖皮质激素、非甾体抗炎药及抗生素,并除外合并严重心、脑、肾等严重疾患者。共有 80 例病例入选,纳入标准参照 2000 年井冈山《全国慢性胃炎研讨会议共识》相关标准[2]。按随机抽签法进行分组。治疗组 42 例,其中男 26 例,女 16 例,最大 64 岁,最小 21 岁,平均年龄(41.34 ± 12.66)岁;其中胃粘膜轻度炎症者 15 例,中度炎症者 17 例,重度炎症者 10 例。对照组 38 例,其中男 21 例,女 17 例,最大 61 岁,最小 20 岁,平均年龄(40.71 ± 11.85)岁;其中胃粘膜轻度炎症者 16 例,中度炎症者 16 例,重度炎症者 6 例。上述一般临床资料经统计学处理,组间各项参数均衡性良好,具有较好的可比性($P>0.05$)。

1.2 诊断标准

西医诊断标准:参照 2000 年井冈山《全国慢性胃炎研讨会议共识》相关标准[2]。

1.3 方法

1.3.1 标本来源及 HP 阳性的诊断方法 胃镜检查时,每例病人取 4 块胃粘膜标本,其中选胃窦部一块用于快速尿素酶试验和 Wanthin-starry 染色,2 种检查均阳性判断为 Hp 阳性,其中一项阳性者不包括在本研究内。其于 3 块胃粘膜标本分别检测 PAF、MK 的表达的和细胞凋亡检测。

1.3.2 胃粘膜细胞的凋亡检测 细胞凋亡时其自身 DNA 断裂成 180~200bp 碎片。根据这一特征,应用末端转移酶介导的 dUTP 切口末段标记法(TUNEL)检测凋亡小体。TUNEL 染色步骤:将胃粘膜标本石蜡包埋、切片后经二甲苯脱蜡,梯度乙醇入水;20mg/L 蛋白酶 K 消化液在室温下作用 20min;3% 双氧水室温下孵育 10min 阻断内源酶;滴加 TUNEL 反应液,37℃,60min;过氧化物酶连接的抗荧光素抗体,37℃,60min;DAB 显色,苏木素复染。光镜下观察切片的显色反应,胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞(凋亡细胞),每张切片至少观察 5 个以上高倍视野,计算 100 个上皮细胞内的阳性细胞数,即为凋亡指数(AI)。Hp 感染的诊断、组织学、细胞凋亡的观察采用双盲法。

1.3.3 检测 PAF、MK 的表达 免疫组化和 Western blotting 法检测 PAF、MK 表达的变化。Western blotting 检测 PAF、MK 的表达参照《分子克隆指南》[3]第 2 版进行。

1.3.3 给药方法 治疗组给予沙棘原花青素,每次 0.25g 口服,3 次 /d,连服 4 周为 1 个疗程。对照组给予三联药物阿莫西林(广州珠海联邦制药)0.5g/ 次,每日 2 次,早晚口服;丽珠得乐(丽珠集团制药厂生产)1 包 / 次,每日 2 次;替硝唑(湖南益阳制药厂生产)0.5g/ 次,每日 2 次。用药 2 周后,再停药 2 周以复查。2 组均于第 4 周复查胃镜,活检取材部位与第 1 次胃镜检查相同(即胃窦大弯侧,小弯侧和前后壁);活检标本分别进行 HP 检验,MK、PAF 检测,细胞凋亡的检测。原位细胞凋亡试剂盒购自武汉博士德生物医药有限公司。MK,PAF 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,Western blotting 及其相关试剂由晶美有限公司提供。

1.3.4 疗效评定标准 根据卫生部《中药新药临床研究指导原则》[2]中的有关标准拟定。治愈,HP 转阴,临床症状消失,胃镜和病理检查粘膜恢复正常;显效,HP 转阴临床症状明显减轻,病变粘膜基本恢复正常;好转,HP 转阴:或强阳性转为弱阳性,临床症状减轻,病变粘膜范围缩小 2/3,炎症程度减轻;无效:Hp 临床症状及病变粘膜无改善。

1.3.5 统计学方法 采用 SPSS10.0 软件包对数据进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,治疗前后比较采用配对 t 检验,组间比较经方差齐性分析后采用成组设计的 t 检验,治愈率比较采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床总疗效比较

沙棘原花青素组(治疗组)总有效率为 88.1%,西药三联组(对照组)为 78.9%,2 组差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组总疗效比较(n,%)

组别	例数	治愈	显效	好转	无效	有效率
治疗组	42	11	15	11	5	88.1*
对照组	38	9	9	12	8	78.9

与对照组比较,*$P<0.05$

2.2 治疗前后胃粘膜上皮凋亡指数的变化

通过分段 TUNEL 法检测的以 DNA 断点为特征的凋亡细胞在光镜下清楚可见,凋亡细胞不仅位于胃粘膜浅表部位,在胃腺的颈部和体部也出现大量的凋亡细胞。2 组患者治疗后胃粘膜凋亡细胞数目均较前明显减少($P<0.05$),组间比较有显著性差异($P<0.05$),见表 2。

2.3 两组治疗前后 HP 根除率比较

沙棘原花青素治疗组 42 例阳性患者经治疗后

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 治疗前后凋亡指数的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	凋亡指数	
		治疗前	治疗后
治疗组	42	15.75 ± 7.65*	4.47 ± 1.21▲
对照组	38	17.48 ± 7.91*	8.71 ± 2.34

注:与对照组比较▲P<0.05;与治疗后比较 *P<0.05

有 32 例转阴,其 HP 根除率为 76.1%,对照组 38 例阳性患者治疗后有 25 例转阴,其 HP 根除率为65.8%,两组比较差异无统计学意义(P>0.05)。

2.4 免疫组化显示慢性胃炎患者胃粘膜周边组织 MK.PAF 的表达

治疗组治疗后 MK 因子表达进一步增强(P<0.01),PAF 因子表达相对于对照组则明显下调,而对照组对 MK、PAF 蛋白表达的作用不明显。见表3。

表 3 2 组治疗前后 MK、PAF 蛋白表达的比较(%,$\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	MK	PAF
治疗组	42	治疗前	3.15 ± 1.36	12.62 ± 3.17
		治疗后	5.58 ± 1.55*▲	5.15 ± 2.15*▲
对照组	38	治疗前	3.07 ± 1.55	11.66 ± 4.31
		治疗后	3.12 ± 1.61	10.70 ± 1.77

注:与本组治疗前比较,*P<0.01;与对照组治疗后比较,▲P<0.01

2.6 Western blotting 检测各组 MK、PAF 的表达

运用 Western blotting 方法检测 MK、PAF 的表达。转膜后,用丽春红染色,没有目标蛋白质残留,其余蛋白质条带清晰,说明转膜成功。

Western blotting 方法检测结果表明:沙棘原花青素可提高 MK 表达水平,下调 PAF 的表达水平,与对照组有显著性差异(P<0.01),与治疗前比也有显著性差异(P<0.01),结果见表 4。

表 4 两组患者治疗前后 PS2,PAF 光密度值检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	PS2 光密度值	PAF 光密度值
治疗组	42	治疗前	81.72 ± 3.23	49.76 ± 4.13
		治疗后	146.78 ± 4.12*▲	20.71 ± 4.42*▲
对照组	38	治疗前	82.67 ± 4.31	47.91 ± 2.33
		治疗后	90.73 ± 1.25	46.52 ± 5.41

注:与本组治疗前比较,*P<0.01;与对照组治疗后比较,▲P<0.01

2.7 MK、PAF 与胃粘膜上皮凋亡指数的相关性分析

经相关分析,慢性胃炎患者胃粘膜上皮凋亡指数与 MK 的 Pearson 相关系数分别为(分别 r=-0.755,P<0.01,呈负相关关系和 PAF 的 Pearson 相关系数为(分别 r=0.784,P<0.01,呈正相关关系,即可以认为慢性胃炎患者胃粘膜上皮凋亡指数与 PAF、MK 之间均有直线相关关系。

3 讨 论

Hp 感染与胃粘膜上皮细胞凋亡的关系是近年来比较热门的话题。在正常情况下,为清除衰老、异常细胞及控制细胞数量和体积,有部分细胞在机体的调控下发生凋亡以维持机体的稳态,当组织细胞发生异常凋亡时则可导致疾病发生[4]。MidkineMK是一类较新的,对胃粘膜有保护作用的因子, 目前认为 Midkine 基因对消化性溃疡的作用主要是通过维持上皮细胞的正常凋亡和防止胃上皮细胞的过度凋亡有关[5,6]。PAF 是一种内源性磷脂介质,它可与内毒素在引起胃肠粘膜损伤上起协同作用,导致胃上皮细胞的过度凋亡,从而导致胃粘膜炎症,甚至溃疡的产生[6,10]。

沙棘(Hippophas rham noides L)为胡颓子科(Elaeagnaceae)酸刺属的灌木或小乔木,是我国藏医、蒙医用于治疗多种疾病的常用药材,也是珍贵的药食两用植物资源。我们实验室将从沙棘茎中分离鉴定出的 SBPC 进行抗慢性胃炎的临床研究,证实其具有很好的抗慢性胃炎的效果。本临床研究均表明,沙棘原花青素能显著减轻慢性胃炎患者胃粘膜愈合过程中的胃粘膜的损害,两组患者治疗后胃粘膜凋亡细胞数目均较前明显减少(P<0.05),组间比较有显著性差异(P<0.05)沙棘原花青素可提高 MK 和下调 PAF 的表达,而对照组对胃粘膜 MK 和 PAF 的表达影响不大。经相关分析,慢性胃炎患者胃粘膜上皮凋亡指数与 PAF、MK 之间均有直线相关关系。沙棘原花青素发挥抗慢性胃炎的机制之一可能与其杀灭 HP 和提高 MK 和下调 PAF 的表达来抑制细胞凋亡有关。

参 考 文 献

[1] 卢世云,潘秀珍.幽门螺杆菌相关性胃病的细胞增殖和凋亡[J].胃肠病学和肝病学杂志,2001;10(1):52-57

[2] 中华人民共和国卫生部.中药新药临床研究指导原则[S].第 2 辑,1995.114-115.

[3] J.萨姆布鲁克,D.W.拉塞尔.分子克隆试验指南(下册)[M]. 北

(下转第 1002 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

样本 K_E 值变化见图 2。

3 讨 论

脂质体与 IL-2 的结合是制备 IL-2 靶向免疫脂质体的关键，本实验分别用戊二醛法、十一醛法、衍生化法 3 种方法制备 IL-2 免疫脂质体，并对其制备方法、IL-2 结合率及稳定性进行了考察。戊二醛为一种双功能交联剂，通过其醛基分别与脂质体膜材磷脂酰乙醇胺和 IL-2 上的氨基共价结合，形成脂质体 - 戊二醛 -IL-2 结合物，但制备过程中难免存在 IL-2、脂质体自身相互交联，不易定量脂质体表面功能基团，且稳定性差，随着保存时间的延长，IL-2 浓度逐渐降低。十一醛法通过双层脂质分子中暴露在水相的亲水醛基与 IL-2 上的氨基形成席夫碱而结合，防止了 IL-2、脂质体自身相互交联，并能通过改变最初与脂质混合时所使用的醛量来改变表面覆盖的范围。所制备的免疫脂质体抗体活性大大提高，且成本低，稳定性好。衍生化法是目前较先进的制备方法，结合率高，稳定性好，但 MPB-PE、SATA 成本较高，限制了该方法的推广。故本实验室拟采用十一醛法作为 IL-2 免疫脂质体的制备方法，并进一步对该方法制备的免疫脂质体的载药情况和对 IL-2 受体阳性细胞的生物学特性进行考察。

参 考 文 献

[1] Konigsberg PJ, Godtel R, Kissel T, et al. The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes[J]. Biochim Biophy Acta, 1998; 1370(2): 243-251.

[2] 黄锦江，黄文方，刘小琦，等.包裹碱性磷酸免疫脂质体的制备[J]. 重庆医科大学学报，2005; 30(1): 92-94.

[3] 郭 迪，潘 力，韩 璐，等.脂质体磷脂与抗体蛋白的偶联方法[J]. 华南理工大学学报(自然科学版)，2005; 33(3): 91-94.

[4] Chung-Gyu P, Natalie WT, Kyung-Mil, et al. Targeting and blocking B7 costimulatory molecules on antigen-presenting cells using CTLA4Ig-conjugated liposomes: in vitro characterization and in vivo factors affecting biodistribution[J]. Pharmaceutical Research, 2003; 20(8): 1239-1248.

[5] 叶伟民，韩焕兴，范列英，等.Bradford 比色法简便、快速测定微量蛋白[J]. 上海医学检验杂志，1996; 11(4): 207-208.

[6] 张 奇，邓英杰.冻融法制备 5- 氟尿嘧啶脂质体及其稳定性考察[J]. 沈阳药科大学学报，2000; 17(2): 87-89.

[7] 汪 冰，杨翰仪.单克隆抗体偶联脂质体的制备及其与胃癌细胞特异结合研究[J]. 沈阳药学院学报，1994; 11(1): 17-20.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 972 页)

京：科学出版社，2002.1713-1726

[4] 李志芳，林庚金.幽门螺杆菌对胃上皮细胞的凋亡作用[J].上海医科大学学报，2000; 27(2): 98-901

[5] 黄国栋，李家邦，黄媛华，等.健胃愈疡颗粒干预下大鼠胃溃疡粘膜乳腺癌相关肽和血小板活化因子的表达及与胃粘膜疏水性的相关性研究[J].中国组织工程研究与临床康复，2007; 50(12): 4169-4173.

[6] 李兆申，湛先保，许国铭.胃粘膜损伤与保护 - 基础与临床[M]. 上海：上海科技出版社，2004.107-111.

[7] Sobhani I, Denizol Y, Moizol L, et al. Regulation of platelet-activating factor production in gastric epithelial cells[J]. Eur J Clin Invest, 1996; 26(1): 53-58.

[8] Suzuki H, Miura S, Imaeda H, et al. Enhanced levels of chemiluminescence and platelet activating factor in urease-positive gastric ulcers[J]. Free Radic Biol Med, 1996; 20(3): 449-454.

[9] Yoshida N, Yoshikawa T, Ando T, et al. Pathogenesis of platelet-activating factor-induced gastric mucosal damage in rats[J]. Scand J Gastroenerol, 1989; 162(supp): 210-214.

[10] 段义民，李兆申，湛先保，等.应激性溃疡时血浆、胃粘膜组织 ET1 的变化及其意义[J]. 第二军医大学学报，1998; 5(19): 455-457.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 999 页)

完善，更具有实时性、实用性、真实性、新颖性，也能够使用户更加方便地检索信息。此外，如何与现有的 HIS 或 LIS 系统集成，实现实时自动提示警告，更好地为临床服务，也需要进一步探索。

参 考 文 献

[1] 贺 勇，涂植光. 药物对实验室检验项目的干扰[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册，2003; 24(2): 122-123.

[2] 董辉苒，苗瑞睿，苗健伟. 药物对常用临床检验指标的影响[J]. 首都医药，2006; 13(20): 37-38.

[3] Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests[M]. 5th ed. Washington: AACC Press, 2000.

[4] 王诗瑾，钱庆文，钱书虹，主编. 实验诊断与药物干扰[M]. 郑州：郑州大学出版社，2002.

[5] 李 娜，张文举. 浅谈知识化医学图书馆[J]. 中华医学图书情报杂志，2006; 15(3): 7-9.

(责任编辑：谭乐勤)