

证的研究 ·

慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡 与中医证型的相关性

徐 珊 周嘉鹤 王常松 杨季国

(浙江中医药大学, 杭州市滨江区滨文路, 310053)

[摘 要] **目的** 探讨大鼠不同证型慢性萎缩性胃炎(CAG)证候发生时胃黏膜细胞凋亡及调控蛋白表达水平的变化,从细胞凋亡的角度揭示CAG各证候的实质。**方法** 复制大鼠脾虚证、肝郁证和湿热证CAG病证结合模型,检测胃黏膜上皮细胞凋亡水平和胃黏膜细胞凋亡调控蛋白Bcl-2、Fas抗原的表达水平。**结果** 各模型组大鼠胃黏膜细胞凋亡指数均显著高于正常对照组,各证候模型组中以脾虚CAG组最高。各模型组大鼠胃黏膜Bcl-2、Fas蛋白表达量均显著高于正常对照组,各证候模型组中以脾虚CAG组最高。**结论** CAG大鼠胃黏膜细胞凋亡指数、Bcl-2、Fas蛋白表达与CAG证候有一定的相关性,以脾虚CAG组大鼠胃黏膜细胞凋亡指数最高和Bcl-2、Fas表达量最高。

[关键词] 肝郁证;脾虚证;湿热证;细胞凋亡;Bcl-2;Fas

Correlation between Apoptosis of Gastric Mucosa with Chinese Medical Pattern in Rats with Chronic Atrophic Gastritis

XU Shan, ZHOU Jia-he, WANG Chang-song, et al.

(Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053)

ABSTRACT **Objective** To explore pattern essence from the aspect of apoptosis by observing apoptosis of gastric mucosa and expression of modulin in chronic atrophic gastritis (CAG) rats with different Chinese medical patterns. **Methods** CAG rat models with spleen deficiency pattern, liver depression pattern and damp heat pattern were copied respectively. Apoptosis of gastric mucosa and expression of Bcl-2 and Fas were detected. **Results** Apoptosis indexes of gastric mucosa and expression of Bcl-2 and Fas in model groups, especially in CAG with spleen deficiency group, were higher than those in normal control group. **Conclusion** There is correlation between apoptosis index of gastric mucosa and expression of Bcl-2 and Fas with Chinese medical pattern in CAG rats. Apoptosis index of gastric mucosa and expression of Bcl-2 and Fas is the highest in CAG with spleen deficiency group.

Key Words Liver depression pattern; Spleen deficiency pattern; Damp heat pattern; Apoptosis; Bcl-2; Fas

对慢性萎缩性胃炎(CAG)患者10~20年的随访发现,有5%~10%的患者发生了胃癌,而在此过程中,细胞凋亡和增殖及其调控基因起着极其重要的作用^[1]。国内已有学者^[2]复制了CAG证病结合模型,检测胃黏膜表面细胞增殖指数和癌基因p53的表达,但对不同证候CAG大鼠胃黏膜细胞凋亡水平及调控基因蛋白质的表达规律则少见报道。本研究复制大鼠肝郁证、脾虚证和湿热证CAG病证结合模型,用原位末端标记法(TUNEL)检测各组大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡水平,免疫组化方法检测各组大鼠胃黏膜细胞凋亡调控蛋白Bcl-2、Fas抗原的表达水平,观察细胞凋亡及调控蛋白表达水平的变化与证候的相关性,从细胞凋亡的角度揭示CAG各证候的实质,以期CAG的中医辨证提供客观依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

健康Wistar雄性大鼠50只,清洁级,体重140~170g。按随机数字法分为5组,即正常对照组、单纯CAG组、脾虚CAG组、湿热CAG组和肝郁CAG组,每组10只。

1.2 主要仪器和试剂

恒温干燥箱:上海产GNP-9080型隔水式恒温培养箱。超声雾化器:润华VN-88型,武汉自动化仪器厂生产。电子湿温度表:TMWS-B1型,天津市天马仪器厂生产。HPIAS-1000病理图文分析系统:武汉同济千屏影像工程公司产品。浓缩型兔抗鼠Bcl-2、Fas,即用型SABC试剂盒,DAB显色试剂盒购自武汉博士德公司。TUNEL检测试剂盒购自北京中山公司。

1.3 造模用药

N-甲-N-硝基-亚硝基胍(MNNG):购自上海化学试剂公司。无水乙醇:分析纯,临用时按比例稀释到浓

度为40%的溶液。生大黄:购自杭州胡庆余堂。肾上腺素:1mg/ml, 购自武汉制药集团股份有限公司。

1.4 CAG 病证结合模型制作

参照文献[3~7]方法并加以改进。MNNG2g, 蒸馏水2000ml 稀释配成浓度1mg/ml 的保存液, 4℃冰箱避光保存。各组大鼠适应性饲养1周, 除正常对照组正常饮水外, 其余各组自由饮用浓度为100μg/ml 的MNNG 稀释液, 饮水瓶避光, 每日更换饮液; 同时用40%的乙醇灌胃, 2ml/只, 每周一、四各灌胃1次, 共10周。(1)脾虚 CAG 模型: CAG 模型复制同时, 第7周开始用苦寒泻下加饥饱失常法建立脾虚证模型。生大黄煎剂灌胃, 浓度为1g/ml, 20ml·kg⁻¹·d⁻¹, 每日1次; 同时采取单日禁食, 双日足量喂食, 连续4周。(2)肝郁 CAG 模型: 7周前方法同上, 第7周开始采用钳子夹大鼠尾部, 使之保持激怒、打斗状态, 每日1次, 30分钟; 同时0.1%肾上腺素每7天腹侧皮下注射1次, 每次每只0.1ml(含肾上腺素0.1mg), 共4次, 造模4周。(3)湿热 CAG 模型: 7周前方法同上, 第7周开始撤除普通饲料, 换用配方为10%猪油、20%蔗糖、2%胆固醇、1%胆酸钠和67%普通饲料的高糖高脂饲料喂养; 每天将大鼠置入造模箱内(恒温干燥箱内置超声雾化器和湿温度表), 调节箱内温度(33±2)℃, 相对湿度(95±3)%, 每天1次, 每次2小时, 造模4周。

1.5 标本的采集和处理

造模结束后剖取各组大鼠胃组织, 将整个胃组织投入到4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定24小时。常规脱水, 石蜡包埋, 4μm 厚度连续切片后进行TUNEL 染色和免疫组化染色。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡水平

采用TUNEL 法检测各组大鼠胃黏膜细胞凋亡水平。TUNEL 法染色步骤参照试剂说明书。所有标本均在HPIAS-1000病理图文分析系统下相同的放大倍数下观察。每张切片观察5个视野, 每个视野计数100个细胞, 计数中凋亡细胞比率的均数为凋亡指数(AI)。阳性细胞核呈黄色或棕色, 细胞核呈蓝色为阴性。

1.7 免疫组织化学染色法检测细胞凋亡调控蛋白水平

采用SABC 法检测各组大鼠胃黏膜 Bcl-2、Fas 蛋白表达水平。免疫组织化学染色步骤参照说明书。利用HPIAS-1000病理图文分析系统采集图像, 半定量分析表达情况。Bcl-2、Fas 均以胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应, 阴性对照除细胞核染成蓝色外, 胞核和胞浆内无棕黄色反应物。每张切片随机选取5个有代表性的视野(×400倍), 经过该系统分析获得5个视野阳性

积分光密度, 平均后代表每个标本的染色强度。

1.8 统计学方法

采用SPSS 10.0软件进行统计学处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 结果采用完全随机设计资料的方差分析方法(One-Way ANOVA)进行分析。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜细胞凋亡水平比较

凋亡细胞的阳性反应物质为棕黄色, 位于细胞核内, 浓缩的核质紧贴于核膜, 或核质呈现均匀的染色。正常对照组大鼠胃黏膜中, 凋亡细胞主要位于表面上皮内, 呈簇状分布或单个散在分布; 单纯 CAG 组、脾虚 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组凋亡细胞数均明显增多, 在黏膜全层均可见到, 呈弥漫性分布。表1结果显示, 单纯 CAG 组和各证候模型组细胞凋亡指数均显著高于正常对照组(均 $P < 0.01$); 其中以脾虚 CAG 组细胞凋亡指数最高($P < 0.01$); 与肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组比较, 单纯 CAG 组细胞凋亡指数最低(均 $P < 0.05$); 肝郁 CAG 组与湿热 CAG 组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表1 各组大鼠胃黏膜细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	细胞凋亡指数(%)
正常对照组	10	3.66±1.41
单纯 CAG 组	10	7.70±2.49*
脾虚 CAG 组	10	13.98±2.55*△△
肝郁 CAG 组	10	10.50±2.02*△▲
湿热 CAG 组	10	10.02±2.19*△▲

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与单纯 CAG 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与脾虚 CAG 组比较, ▲ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2 表达水平比较

Bcl-2以胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应, 阴性对照除细胞核染成蓝色外, 胞核和胞浆内无棕黄色反应物。正常对照组大鼠胃黏膜中 Bcl-2有少量表达。单纯 CAG 组、脾虚 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组 Bcl-2表达量明显增多。表2结果显示, 正常对照组 Bcl-2积分光密度值与单纯 CAG 组、脾虚 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组比较差异均有非常显著性意义(均 $P < 0.01$)。脾虚 CAG 组 Bcl-2积分光密度值与单纯 CAG 组、湿热 CAG 组比较, 表达量最高(均 $P < 0.01$), 与肝郁 CAG 组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。单纯 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组3组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠胃黏膜 Fas 表达水平比较

Fas 以胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应, 阴性对照除细胞核染成蓝色外, 胞核和胞浆内无棕黄

色反应物。正常对照组大鼠胃黏膜中 Fas 有少量表达,单纯 CAG 组、脾虚 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组 Fas 表达量明显增多。表2结果显示,正常对照组 Fas 积分光密度值与单纯 CAG 组、脾虚 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组比较差异均有显著性意义(均 $P < 0.01$)。脾虚 CAG 组 Fas 积分光密度值最高,与单纯 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组比较差异均有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。单纯 CAG 组、肝郁 CAG 组、湿热 CAG 组3组间比较差异无显著性意义(均 $P > 0.05$)。

表2 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2、Fas 积分光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2	Fas
正常对照组	10	15.09±7.36	21.84±12.28
单纯 CAG 组	10	64.96±17.22*△△	47.32±15.09*△△
脾虚 CAG 组	10	95.58±27.08*	74.01±16.48*
肝郁 CAG 组	10	74.03±14.33*△	51.53±21.35*△
湿热 CAG 组	10	69.65±19.10*△△	55.36±16.50*△

与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与脾虚 CAG 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3 讨论

1972年,由英国学者 Kerr 等首先提出细胞凋亡(APO),用以描述一种在形态上有别于细胞坏死的细胞死亡过程。已有的研究表明^[8,9],从正常胃黏膜到萎缩性胃炎、肠化生,细胞凋亡指数及细胞增殖指数均呈递增趋势,细胞凋亡与细胞增殖呈正相关,而从肠化生到异型增生、胃癌,细胞凋亡指数递减,细胞增殖指数仍呈递增趋势,细胞凋亡与细胞增殖呈负相关。本研究也显示,正常对照组大鼠胃黏膜中凋亡细胞很少,而各模型组凋亡细胞数明显增多,在黏膜全层均可见到,呈弥漫性分布,表明 MNNG 和乙醇可刺激胃黏膜组织细胞发生变化,在这一过程中存在着大量的细胞凋亡,即细胞的不稳定性明显增加。

关于细胞凋亡与中医证型的相关性研究,国内已有个别报道^[10]。本实验发现,在不同证型的慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜中,细胞凋亡指数也存在差异。细胞凋亡指数从高到低的顺序是:脾虚 CAG 组→肝郁 CAG 组→湿热 CAG 组→单纯 CAG 组→正常对照组。其中脾虚 CAG 组明显高于肝郁 CAG 组和湿热 CAG 组,肝郁 CAG 组和湿热 CAG 组比较差异无显著性意义。说明慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡指数与 CAG 证候有一定的相关性。

目前已知凋亡调控基因 Bcl-2家族相关基因蛋白与胃癌的发生关系密切。国内大多数报道也显示萎缩性胃炎和胃癌前病变时 Bcl-2表达水平是升高的^[11,12]。

本实验也发现,正常对照组大鼠胃黏膜中 Bcl-2表达量较少,而各模型组胃黏膜组织中 Bcl-2表达量较正常对照组明显升高。

关于细胞凋亡调控蛋白 Bcl-2与中医证型的相关性研究,国内已有个别报道^[10],但对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜 Bcl-2表达量与中医证型的相关性则少见报道。本研究还发现,不同证候 CAG 大鼠胃黏膜 Bcl-2表达量也存在差异,脾虚 CAG 组大鼠 Bcl-2积分光密度值明显高于肝郁 CAG 组和湿热 CAG 组大鼠,肝郁 CAG 组和湿热 CAG 组 Bcl-2积分光密度值差异无显著性意义。说明 Bcl-2的表达量与 CAG 证候有一定的相关性。

Fas 蛋白在慢性萎缩性胃炎胃黏膜表达变化的报道不尽一致。贾百灵等^[13]用免疫组化方法检测发现,胃黏膜不典型增生及胃癌组织中 Fas 蛋白阳性率较正常组织明显下降($P < 0.05$)。张沥等^[14]研究发现,热盐水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎胃黏膜组织中的凋亡细胞数明显增多,Fas 在热盐水灌胃所致的萎缩性胃炎中的表达率显著高于正常胃黏膜($P < 0.05$)。本研究也发现,正常对照组大鼠胃黏膜中 Fas 蛋白表达量较少,而各模型组胃黏膜组织中 Fas 蛋白表达量较正常对照组明显升高。

细胞凋亡调控蛋白 Fas 与中医证型的相关性研究,国内已有个别报道^[10],但对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜 Fas 表达量与中医证型的相关性则少见报道。本研究还发现,不同证候 CAG 大鼠胃黏膜 Fas 蛋白表达量也存在差异,脾虚 CAG 组大鼠 Fas 积分光密度值明显高于肝郁 CAG 组和湿热 CAG 组大鼠,肝郁 CAG 组和湿热 CAG 组 Fas 积分光密度值差异无显著性意义。说明 Fas 蛋白的表达量与 CAG 证候有一定的相关性。

参考文献

[1]张玲霞,张沥.细胞凋亡及其调控基因与萎缩性胃炎.世界华人消化杂志,2002,10(5):581~583.
[2]刘晓颖,陈小野,李卫红,等.CAG 证病结合模型的胃黏膜病理和癌基因表达研究.中国中医基础医学杂志,1999,5(2):31~35.
[3]崔儒涛,蔡淦,杨秋泓,等.养胃冲剂治疗慢性萎缩性胃炎的实验研究.中国医药学报,1998,13(6):32~33.
[4]杨冬花,李家邦,郑爱华,等.脾气虚证模型大鼠 Th1/Th2 细胞因子的失衡以及四君子汤的干预作用.中国医师杂志,2004,6(2):181~183.
[5]刘冬梅.健胃安中方对脾胃湿热大鼠胃黏膜环核苷酸含量的影响及组织病理学观察.中国中西医结合消化杂志,2000,9(3):160~161.
[6]陈爽白,常淑枫,肖照岑,等.湿热证大鼠模型的复制及三仁

汤对其影响的实验观察·天津中医, 2002, 19(2): 38~40.

- [7] 须惠仁. 肝郁证的动物实验研究——— 刺激刺激对大白鼠血流变学的影响. 中医杂志, 1991, 32(6): 44~47.
- [8] 许岸高, 李绍光, 刘集鸿, 等. 胃癌癌前病变演化与细胞凋亡和增殖的关系. 中华医学杂志, 1999, 79(3): 185~186.
- [9] 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其癌前变中细胞凋亡与细胞增殖的关系的研究. 世界华人消化杂志, 1999, 7(8): 649~651.
- [10] 李灿东, 高碧珍, 兰启防, 等. 慢性胃炎脾胃湿热证患者胃黏膜细胞凋亡及相关蛋白的研究. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(9): 667~669.
- [11] 张玲霞, 张沥, 徐俊荣, 等. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎胃黏

膜组织细胞凋亡及其调控基因蛋白表达影响的实验研究. 陕西医学杂志, 2003, 32(3): 210~212.

- [12] 林庚金, 范钰, 钱立平, 等. 大鼠胃黏膜癌变过程细胞凋亡及相关癌基因 Bcl-2、c-myc 的动态表达. 上海医学, 2001, 24(7): 417~419.
- [13] 贾百灵, 李继昌, 黄河, 等. 胃腺癌发生过程中 Fas、Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化. 中华消化杂志, 1999, 19(4): 267~268.
- [14] 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 等. 热盐水致胃黏膜细胞凋亡及对热休克蛋白表达影响. 世界华人消化杂志, 2003, 11(12): 2038~2040.

(收稿日期: 2006-07-26; 修回日期: 2006-10-12)

通心络胶囊联合西药治疗慢性充血性心力衰竭42例

冯俊平 范 谦 缪国斌 张 麟

(首都医科大学附属北京朝阳医院中医科, 综合内科, 北京市朝阳区白家庄路8号, 100020)

慢性充血性心力衰竭(CHF), 主要归属于中医“心悸”、“喘证”、“水肿”等范畴。我们从2004年6月~2005年7月应用通心络胶囊联合规范的西药治疗 CHF, 现将结果报告如下。

1 临床资料

收集首都医科大学附属北京朝阳医院2004年6月~2005年7月 CHF 患者42例, 均有不同程度的左心室收缩功能不全, 心功能 NYHA 分级 II~IV 级, 左心室射血分数(LVEF) $\leq 45\%$ 。随机分为通心络组和常规治疗组各21例。通心络组男13例, 女8例; 平均年龄(52.29 $\pm$ 11.57) 岁。常规治疗组21例, 男11例, 女10例; 平均年龄(54.19 $\pm$ 16.39) 岁。排除标准: 严重瓣膜疾病, 活动性心肌炎, 心绞痛发作, 未安装起搏器的 II、III 度房室传导阻滞(AVB), 无法控制的心律失常, 有症状的外周血管疾病, 慢性阻塞性肺气肿, 支气管哮喘, 1型糖尿病和慢性肝、肾疾病者。

2 治疗方法

常规治疗组遵循《心力衰竭治疗指南》原则接受利尿剂(双氢克尿塞每次12.5mg, 每日1次; 安体舒通每次20mg, 每日1次)、血管紧张素转换酶抑制剂(卡托普利每次12.5mg, 每日3次)、 β 受体阻滞剂(倍他乐克每次12.5~25mg, 每日2次)和洋地黄(地高辛每次0.125mg, 每日1次)等规范治疗。通心络组在上述常规治疗的基础上, 加服通心络, 每次4粒, 每日2次。

观察指标: 两组治疗前及治疗1年后, 比较血压、心率的变化, 并比较心脏结构和功能改变的相关指标: 包括左室收缩末内径(LVESD)、左室舒张末内径(LVEDD)、LVEF、心功能 NYHA 分级和6分钟步行试验等。

3 治疗结果

3.1 两组患者治疗前后血压和心率变化的比较

两组治疗1年后, 收缩压及舒张压均无明显变化($P > 0.05$)。常规治疗组治疗前心率为(95.48 $\pm$ 8.65) 次/分钟, 治疗后为(67.05 $\pm$ 8.30) 次/分钟; 通心络组分别为(96.14 $\pm$ 1.00) 次/分钟和(71.71 $\pm$ 5.41) 次/分钟, 均明显低于治疗前($P < 0.01$), 两组治疗后心率比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 提

示通心络有提高心率的可能。

3.2 两组患者心脏超声心动图各项相关指标的比较

治疗前 LVESD、LVEDD 和 LVEF 两组间比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。治疗后各组上述相关指标均有明显改善($P < 0.01$)。两组治疗后比较, 通心络组 LVEF 为(45.13 $\pm$ 1.01) % 明显高于常规组的(41.51 $\pm$ 1.08) % ($P < 0.05$), 其余资料略。

3.3 两组患者心功能 NYHA 分级变化的比较

治疗前心功能 IV 级的患者, 常规组10例, 通心络组12例; 心功能 III 级的患者, 常规治疗组8例, 通心络组7例; 心功能 II 级的患者, 常规治疗组3例, 通心络组2例; 两组间比较心功能分级差异无显著性意义。治疗1年后, 各组的心功能分级均有明显改善; 但两组间比较, 心功能 III 级的患者, 通心络组为3例, 明显低于常规治疗组的10例; 心功能 II 级的患者通心络组为15例, 常规治疗组为11例; 心功能 I 级的患者, 常规组0例, 通心络组3例。提示通心络能更好地改善患者的心功能。

3.4 两组患者6分钟步行试验的比较

通心络组治疗前6分钟步行试验结果: 治疗前为(230.48 $\pm$ 7.22) m, 治疗后为(424.29 $\pm$ 10.05) m, 有明显改善($P < 0.01$); 常规治疗组分别为(239.05 $\pm$ 10.91) m 及(395.24 $\pm$ 9.04) m, 也有明显改善($P < 0.01$)。但通心络组6分钟步行试验结果改善程度平均为213.81m, 而常规治疗组为156.19m, 提示通心络组能更好地提高患者的生活质量。

4 讨论

中医学认为, 心力衰竭多是由于心气亏虚, 运血无力而致血脉瘀阻, 不能温煦全身, 故临床常见心悸气短, 活动后加重, 胸闷憋气, 畏寒肢冷等症。同时气虚又会导致水失健运, 气化失常, 加之血脉瘀滞, 停而为水, 聚而成痰。通心络胶囊中人参能补益心气, 有促进血液循环, 增加心肌收缩力, 减慢心率, 增加心排出量和冠脉血流量的作用。赤芍、土鳖虫活血化瘀通经疏络; 全蝎、蜈蚣搜风涤痰, 解痉通络。临床研究显示, 该药有解除冠脉痉挛, 保护和改善内皮功能的疗效。

(收稿日期: 2006-10-27; 修回日期: 2007-05-08)