

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.09.017

护胃散对急进高原大鼠胃黏膜 VEGF 和 bFGF mRNA 表达的影响

李军茹^{*}, 贾守宁, 杨翠兰, 曹生海, 邹小云, 王双玺, 李欣, 李亚伟

(青海省中医院, 青海省西宁市城东区七一路 338 号, 810000)

摘要 目的 探讨护胃散治疗急进高原胃黏膜损伤的可能作用机制。方法 350 只 Wistar 大鼠随机分为北京组、西宁组、玛多空白组、玛多阳性对照组和护胃散高、中、低剂量组, 每组 50 只。除北京组外, 余 300 只大鼠空运至西宁市, 玛多空白组、玛多阳性对照组和护胃散高、中、低剂量组当日继续由汽车运至玛多县。北京组、西宁组、玛多空白组灌服生理盐水 2 ml, 玛多阳性对照组给予荆花胃康胶丸 2.4 g/(kg·d), 护胃散低、中、高剂量组分别给予护胃散 2.6、5.2、10.4 g/(kg·d), 共计 7 天。各组分别于实验第 1、2、3、5、7 天处死 10 只大鼠, 取胃黏膜组织进行病理观察, 同时测定胃黏膜血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维生长因子 (bFGF) mRNA 表达。结果 玛多空白组大鼠胃黏膜表面散在出血点、糜烂或浅表溃疡, 局部黏膜有缺损改变; 护胃散高剂量组黏膜下血管淤血、炎性渗出等较玛多空白组有较大改善。与玛多空白组同时间比较, 护胃散中、高剂量组在第 3、5 天有不同程度的 VEGF、bFGF mRNA 表达升高, 且护胃散高剂量组在第 2、3 天 VEGF mRNA 表达升高优于玛多阳性对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 护胃散可提高急进高原大鼠胃黏膜中 VEGF 及 bFGF mRNA 的表达, 从而促进急进高原胃黏膜损伤的修复。

关键词 急进高原; 护胃散; 胃黏膜损伤; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维生长因子

急进高原可导致机体对高原环境产生许多应激性反应, 其中胃肠道的表现尤为突出^[1]。中医学认为, 低氧、寒冷作为高原环境最主要的特征, 易导致人体出现气虚血瘀证^[2], 首先表现为胃肠动力的下降、食欲减退、胃肠道黏膜损伤等。研究^[3-4]表明, 高原缺氧环境急慢性暴露, 可使机体交感神经、迷走神经等兴奋性增加, 引起胃肠黏膜组织中血流量减少, 微血管损伤, 进而通透性增加, 使胃肠道黏膜结构的完整性和屏障功能严重受损, 导致机体发生一系列的病理性改变, 其中血管内皮生长因子 (VEGF) 及碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 在血管新生、损伤修复过程中发挥着重要作用。中藏药复方护胃散在临床应用 20 余年, 为了明确其作用机制, 本研究观察护胃散对急进高原大鼠胃黏膜的 VEGF 和 bFGF mRNA 表达的影响, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级 Wistar 大鼠 350 只, 8 ~ 10 周龄,

雌雄各半, 体质量 (220 ± 10) g, 由北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0002。

1.2 药品

护胃散由黄芪、白术、红景天、白芷、白及、三七粉 (比例为 5 : 3 : 2 : 2 : 3 : 1) 等中药组成, 采用水提法提取, 制成含生药 1 g/ml 溶液, 于 4℃ 冰箱中保存备用。荆花胃康胶丸 (国药准字: Z10970067), 天士力制药集团股份有限公司, 批号: 130702。生理盐水 (批号: E16021904-1), 湖南科伦制药有限公司; BX53F 型显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.3 主要试剂及仪器

VEGF 和 bFGF mRNA RT-qPCR 反转录试剂盒 / RT-qPCR 扩增试剂盒为美国 Promega 公司产品 (批号分别为: 0000199812、0000197903)。Real-Time 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; Roche LightCycler480, 北京优利泰德科技有限公司; BX53F 型显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.4 动物分组与干预方法

350 只大鼠按区组随机化法分为北京组、西宁组、玛多空白组、玛多阳性对照组和护胃散高、

基金项目: 青海省科技计划 (2014-ZJ-918)

* 通讯作者: qhxnlijunru@sina.com, 13519732841

中、低剂量组, 每组 50 只。除北京组外, 余 300 只大鼠空运至西宁市, 玛多空白组、玛多阳性对照组和护胃散高、中、低剂量组当日继续由汽车运至玛多县。第 2 天北京组、西宁组、玛多空白组灌服生理盐水 2 ml, 玛多阳性对照组给予荆花胃康胶丸 2.4 g/(kg·d), 护胃散低、中、高剂量组分别给予护胃散 2.6、5.2、10.4 g/(kg·d), 各组均于每天早晨 9 时灌胃 1 次, 共计 7 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大体表征观察 观察 7 天内各组大鼠的活动情况, 毛色、舌质、舌下络脉及摄食摄水量、粪质等。

1.5.2 胃黏膜组织病理切片观察 分别观察灌胃第 1、2、3、5、7 天各组大鼠取胃黏膜组织采用显微镜观察病理学变化。

1.5.3 胃黏膜组织中 VEGF 和 bFGF mRNA 表达水平检测 分别于灌胃第 1、2、3、5、7 天取材, 每个时间点 10 只大鼠。10% 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔麻醉, 打开腹腔分离鼠胃, 沿胃大弯剪开, 并用生理盐水冲净胃内食物残渣后置于平皿中, 剪取 1 cm × 1 cm 胃壁黏膜组织, 用锡箔纸包裹放于冷冻管内后迅速置于液氮罐中, -80℃ 保存备用。采用 Trizol 法分别提取出各组大鼠胃黏膜组织中总 RNA, 并检测 RNA 在 A260/A280 处的比值, 取 1.8 ~ 2.0 范围内 RNA; RT-PCR 扩增 VEGF 和 bFGF mRNA, 选用 GAPDH 作为内参照基因。引物由上海生工生物工程有限公司设计、合成, VEGF: 上游: 5'-TGCCAAGTGGTCCCAG-3'; 下游: 5'-CG-CACACCGCATTAGG-3', 扩增片段长度 190bp; bFGF: 上游: 5'-CCAGTTGGTATGTGGCACTG-3'; 下游: 5'-CAGGGAAGGGTTTGACAAGA-3', 扩增片段长度 245bp; GAPDH: 上游: 5'-ACCCATCAC-CATCTTCCAGGAG-3'; 下游: 5'-GAAGGGGCG-GAGATGATGAC-3', 扩增片段长度 159bp。PCR 反应条件: 94℃ 30s, 高温变性; 60℃ 1min, 低温退火; 68℃ 2min, 引物延伸; 40 个循环, 溶解分析。PCR 产物采用 Roche Light Cycler 480 进行荧光定量分析, 以 GAPDH 为内对照, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析, 得出相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件分析, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多个样本均数比较用单因素方差分析, 两两组间显著性差异用 Dunnett-t 检验或 LSD 检验分析的方法, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠表征观察

北京组大鼠活动量较大, 反应灵敏, 毛色富有光泽, 摄食、水量均正常, 粪便质软、形态正常, 舌质淡红; 与北京组比较, 西宁组大鼠以上表征变化不甚明显; 玛多空白组大鼠的活动量明显减少, 被毛蓬松无华、色枯燥黯淡, 摄食、水量均明显减少, 粪便稀溏或不成形, 舌暗红或紫暗, 舌边伴或不伴有瘀斑, 舌下脉络有扩张迂曲的表现。各用药组上述症状得到改善, 尤其是护胃散中、高剂量组改善明显, 大鼠活动量、摄食及摄水量较玛多空白组增加, 粪便稀软、舌色紫暗、舌边瘀斑较玛多空白组改善。

2.2 各组大鼠胃黏膜病理学改变

北京组大鼠胃黏膜表面平坦、光滑, 显微镜下可见黏膜各层结构清晰, 细胞、腺体排列整齐、有序, 胞核胞浆比例正常, 无血管扩张充血、淤血及红细胞渗出, 无炎性细胞浸润及组织水肿。西宁组大鼠胃黏膜显微镜下可见细胞、腺体排列较为有序, 有不同程度的血管扩张、淤血、炎性细胞浸润。玛多空白组大鼠胃黏膜表面散在出血点、糜烂或浅表溃疡, 显微镜下可见胃黏膜组织上皮细胞不同程度的变性、脱落及坏死, 局部黏膜有缺损改变, 黏膜下的血管内有不同程度的扩张充血、淤血和渗出, 较为明显的炎性细胞浸润及组织水肿, 细胞核呈现固缩变小的改变。其中, 病理改变以实验第 2、3 天较为突出。各用药组以上病理性改变均得到了不同程度的改善, 尤其是护胃散中、高剂量组改善明显, 玛多阳性对照组黏膜下血管淤血、炎性渗出等较玛多空白组改善, 护胃散中剂量组与玛多阳性对照组接近, 护胃散低剂量组较玛多空白组变化不明显, 护胃散高剂量组黏膜下血管淤血、炎性渗出等较玛多空白组有较大改善。

2.3 各组大鼠不同时间胃黏膜 VEGF 和 bFGF mRNA 表达比较

表 1 示, 与北京组同时间比较, 西宁组和玛多空白组各时间 VEGF mRNA 表达明显升高, 西宁组第 2、3、7 天和玛多空白组第 2、3、5、7 天 bFGF mRNA 表达亦明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与玛多空白组同时间比较, 玛多阳性对照组第 2 天 VEGF mRNA 升高; 护胃散中剂量组第 2、3、5 天 VEGF mRNA 升高, 第 3、5、7 天 bFGF mRNA 表达升高; 护胃散高剂量组第 2、3、5、7 天 VEGF mRNA 升高, 第 3、5、7 天 bFGF mRNA 表达升高

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与玛多阳性对照组同时间比较,护胃散高剂量组第 2、3 天 VEGF mRNA 升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间胃黏膜 VEGF 和 bFGF mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	VEGF mRNA	bFGF mRNA
北京组	第 1 天	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	第 2 天	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	第 3 天	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	第 5 天	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	第 7 天	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
西宁组	第 1 天	10	1.07 ± 0.02*	1.05 ± 0.03
	第 2 天	10	1.08 ± 0.02*	1.05 ± 0.01*
	第 3 天	10	1.08 ± 0.01**	1.10 ± 0.05*
	第 5 天	10	1.09 ± 0.02*	1.08 ± 0.09
	第 7 天	10	1.09 ± 0.02*	1.11 ± 0.08*
玛多空白组	第 1 天	10	1.09 ± 0.02**	1.09 ± 0.09
	第 2 天	10	1.09 ± 0.01**	1.14 ± 0.10*
	第 3 天	10	1.13 ± 0.05*	1.14 ± 0.10*
	第 5 天	10	1.22 ± 0.09**	1.20 ± 0.07**
	第 7 天	10	1.33 ± 0.06**	1.34 ± 0.07**
玛多阳性对照组	第 1 天	10	1.10 ± 0.03	1.07 ± 0.06
	第 2 天	10	1.13 ± 0.03 [△]	1.11 ± 0.06
	第 3 天	10	1.15 ± 0.04	1.16 ± 0.05
	第 5 天	10	1.23 ± 0.06	1.21 ± 0.05
	第 7 天	10	1.35 ± 0.07	1.35 ± 0.05
护胃散低剂量组	第 1 天	10	1.09 ± 0.02	1.11 ± 0.09
	第 2 天	10	1.10 ± 0.02	1.13 ± 0.10
	第 3 天	10	1.13 ± 0.02	1.13 ± 0.10
	第 5 天	10	1.22 ± 0.05	1.17 ± 0.10
	第 7 天	10	1.33 ± 0.11	1.30 ± 0.10
护胃散中剂量组	第 1 天	10	1.10 ± 0.01	1.13 ± 0.09
	第 2 天	10	1.15 ± 0.04 ^{△△}	1.15 ± 0.09
	第 3 天	10	1.17 ± 0.08 [△]	1.17 ± 0.10 [△]
	第 5 天	10	1.29 ± 0.05 ^{△△}	1.24 ± 0.05 [△]
	第 7 天	10	1.35 ± 0.05	1.37 ± 0.03 [△]
护胃散高剂量组	第 1 天	10	1.12 ± 0.04	1.14 ± 0.10
	第 2 天	10	1.16 ± 0.02 ^{△△▲}	1.16 ± 0.10
	第 3 天	10	1.21 ± 0.09 ^{△▲}	1.18 ± 0.07 [△]
	第 5 天	10	1.37 ± 0.02 ^{△△}	1.27 ± 0.05 ^{△△}
	第 7 天	10	1.38 ± 0.03 ^{△△}	1.44 ± 0.05 ^{△△}

注: VEGF, 血管内皮生长因子; bFGF, 碱性成纤维生长因子; 与北京组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与玛多空白组同时间比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$; 与玛多阳性对照组同时间比较, $\triangle P < 0.05$

3 讨论

低氧、干燥、寒冷为高原地区的主要气候特征,在此环境中人体易出现气虚血瘀证,急进高原引起的应激性胃黏膜损伤属于中医学“胃痞”“胃脘痛”范畴。当机体受到缺氧、寒冷等应激刺激后,可导致迷走神经、交感-肾上腺髓质系统兴奋性增加,使儿茶酚胺、胃酸等物质分泌量增加,血管收缩,血流量减少,引起胃黏膜缺血、缺氧,增加黏膜微血管的通透性,最终造成胃黏膜屏障及黏

膜微循环的损伤而引起应激性胃黏膜损伤,甚至胃肠道出血^[8]。中医学认为,急进损伤病机为大气不足、宗气虚弱、脾胃虚弱、气虚血瘀、络脉失养。脾胃虚弱无以运化,以致于气血生化无源,则可表现出活动量、摄食及摄水量减少,粪便稀溏或不成形;气虚血瘀,气血运行不畅,无以滋养毛发,则可出现被毛蓬松无华、色枯燥黯淡,舌质暗红或紫暗,舌边伴或不伴有瘀斑,舌下脉络有扩张迂曲。故自拟护胃健脾、益气活血、化瘀通络之中藏药复方护胃散。方中黄芪、白术益气健脾,温中补虚;红景天能补、能和,补益和中,益气活血;三者配伍和中健脾益胃气,能够增强机体的整体抗病能力;白芷、白及、三七消肿、生肌、敛疮、止血,可祛腐生肌、止血宁络,是胃病消肿止痛、生肌敛疮的传统良药。相关研究表明,荆花胃康胶丸可促进损伤黏膜的愈合^[9],故本实验将其作为阳性对照药,以进一步探讨护胃散的作用。

VEGF 是作用于血管内皮细胞而具有特异性的糖基化有丝分裂因子,能诱导并促进新生血管的发生、生成以及内皮细胞的增殖等^[10]。研究报道,缺血、缺氧可明显提升损伤部位 VEGF mRNA 的表达水平,24h 增加的水平显著高于 2h,并于 1~2 周后表达含量逐渐下降,具有一定的时间相关性^[8]。bFGF 在正常组织中处于低表达状态,而在缺血、缺氧及创伤等组织中表达水平明显增加,间接促进血管的生成,改善微循环,起到使损伤黏膜、组织等再生和修复的重要作用^[10-11]。Ley 等^[11]研究发现,VEGF 与 bFGF 具有较强的协同效应,后者可通过促进前者的表达水平来加速损伤部位的愈合过程。

北京市海拔 44 m,西宁市海拔 2260 m,玛多县海拔 4270 m (此来源为实验操作地点的实测海拔高度),本研究观察随着海拔的升高、时间的延长,大鼠胃黏膜组织中 VEGF 和 bFGF mRNA 水平的变化情况。结果显示,西宁组大鼠胃黏膜受到了不同程度的损伤,玛多空白组比西宁组胃黏膜损伤严重。护胃散高、中剂量组与玛多空白组比较胃黏膜损伤减轻,可提高胃黏膜组织中 VEGF 和 bFGF mRNA 整体的表达水平,从而促进黏膜上皮细胞新生及肉芽组织生长,加快组织创面的修复。同时,护胃散低剂量组大鼠胃黏膜组织中 VEGF 和 bFGF mRNA 的表达水平并未呈现上升趋势,反则下降,这种现象的出现可能是由于所给药物浓度不足、半衰期短以致来不及作用于机体受损部位就已经被代谢、分解,加之大鼠的适应性、耐受性、胃黏膜损

伤与愈合的程度等诸多因素综合造成的。总之,护胃散能有效提升急进高原损伤大鼠胃黏膜组织中 VEGF 和 bFGF mRNA 的表达水平,可能是其治疗高原胃黏膜损伤的作用机制之一。

参考文献

- [1] LEÓN-VELARDE F, MAGGIORINI M, REEVES JT, et al. Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases [J]. High Alt Med Biol, 2005, 6(2): 147-157.
- [2] 李军茹, 陈卫国, 贾宁宁, 等. 藏药复方对高原气虚血瘀证动物微循环影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 56-58.
- [3] YOSHIMOTO M, SASAKI M, NARAKI N, et al. Regulation of gastric motility at simulated high altitude in conscious rats [J]. J Appl Physiol, 2004, 97(2): 599-604.
- [4] 周波, 杨定周, 周其全. 模拟高原低氧环境暴露下家兔小肠黏膜扫描电镜观察 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(8): 751-753.
- [5] BRZOZOWSKI T, ZWIRSKA-KORCZALA K, KONTUREK PC, et al. Role of circadian rhythm and endogenous melatonin in pathogenesis of acute gastric bleeding erosions induced by stress [J]. J Physiol Pharmacol, 2007, 58(Suppl

6): 53-64.

- [6] 张学智, 杨国生, 李宁, 等. 荆花胃康胶丸对胃溃疡大鼠黏膜组织表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子含量的影响 [J]. 中医杂志, 2009, 50(6): 547-549.
- [7] PICHIULE P, AGANI F, CHAVEZ JC, et al. HIF-1 alpha and VEGF expression after transient global cerebral ischemia [J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 530: 611-617. PMID: 14562758.
- [8] 周青, 陈志钧, 赵丽, 等. 血管内皮生长因子 mRNA 表达及 ARPE-19 细胞增生与缺氧的诱导效应 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(19): 3712-3714.
- [9] 曾环想, 张宏波, 黄凯, 等. 碱性成纤维细胞生长因子的药理学研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(11): 949-952.
- [10] ZITTERMANN SI, ISSEKUTZ AC. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression [J]. Am J Pathol, 2006, 168(3): 835-846.
- [11] LEY CD, OLSEN MW, LUND EL, et al. Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by Angiopoietin-2 in a modified in vivo Matrigel assay [J]. Microvasc Res, 2004, 68(3): 161-168.

Effect of *Huwei San* (护胃散) on Expression of VEGF and bFGF mRNA in Gastric Mucosa of Rats with Rush Entry into Plateau

LI Junru, JIA Shouning, YANG Cuilan, CAO Shenghai, ZOU Xiaoyun, WANG Shuangxi, LI Xin, LI Yawei (Chinese Medicine Hospital of Qinghai Province, Qinghai 810000)

ABSTRACT Objective To explore possible mechanism of *Huwei San* (护胃散) in treating gastric mucosal injury in rush entry into plateau. **Methods** Randomly divided 350 Wistar rats into Beijing group, Xining group, Madoi blank group, Madoi positive control group and *Huwei San* high, middle and low dose groups, with 50 rats in each group. Except for Beijing group, the other 300 rats were delivered to Xining city by air. The Madoi blank group, Madoi positive control group and *Huwei San* high, middle and low dose groups were successively delivered to Madoi County by bus on that day. Beijing group, Xining group and the Madoi blank group were perfused with 2ml saline. Madoi positive control group was given *Jinghua Weikang Capsule* (荆花胃康胶丸) 2.4 g/(kg · d). *Huwei San* low, middle and high dose group were respectively given *Huwei San* of 2.6 g/(kg · d), 5.2 g/(kg · d) and 10.4 g/(kg · d), for 7 days totally. Ten rats in each group were sacrificed on the 1st, 2nd, 3rd, 5th and 7th day of the experiment. Took gastric mucosal tissue and conducted pathological observation. At the same time, examined the expression of mRNA of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in gastric mucosa. **Results** There were scattered hemorrhagic spots, erosion or superficial ulcer in surface of gastric mucosa and defect change in local mucosa of rats in the Madoi blank group; congestion and inflammation exudation in submucosal vessels in the *Huwei San* high dose group improved much compared with the Madoi blank group. Compared with that in the Madoi blank group at the same time, there were different levels of expression increase of VEGF, and bFGF mRNA in the *Huwei San* high and middle dose groups on the 3rd and 5th day. And on the 2nd and 3rd day, the expression increase of VEGF mRNA in the *Huwei San* high dose group was superior to the Madoi positive control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Huwei San* could increase the expression of VEGF and bFGF mRNA in gastric mucosa of rats with rush entry into plateau. Thus it could improve repair of gastric mucosal injury in rush entry into plateau. **Keywords** rush entry into plateau; *Huwei San*; gastric mucosal injury; vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor

(收稿日期: 2016-11-29; 修回日期: 2017-01-11)

编辑: 邓 媛