

• 实验研究 •

益气清热方对 I 型幽门螺杆菌感染裸鼠胃黏膜
p53、bcl-2 表达的影响

陆为民* 吴 静 沈 洪 杨学文 朱萱萱 李克涓 朱长乐 单兆伟

江苏省中医院消化科、检验科、药理研究室、病理科, 江苏省南京市汉中路 155 号, 210029)

基金项目: 江苏省中医药管理局课题(200304)

* 通讯作者: wmlu@163.com, (025)86617141 转 91600

[摘要] 目的 观察益气清热方对 I 型幽门螺杆菌(Hp)感染的干预作用及机制。方法 将 100 只雄性裸鼠随机分为正常组、模型组、黄芪组、黄芩组、益气清热方组, 每组 20 只。正常组及模型组予生理盐水, 其余分别给予黄芪、黄芩及益气清热方药液, 每日 0.2ml/10g。第 14 天, 除正常组外, 其余各组予浓度 10^8 cfu/ml 的 Hp 菌液灌胃, 每天 1.3ml, 两周后处死, 观察胃黏膜 p53、bcl-2 的表达情况。结果 与正常组比较, 模型组胃黏膜 p53、bcl-2 表达明显增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 3 个药物组均能显著降低 p53、bcl-2 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 3 个药物组间比较, 益气清热方组明显为优($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 益气清热方对 I 型 Hp 感染裸鼠胃黏膜 p53、bcl-2 表达有一定的抑制作用, 可能是通过对凋亡基因的调控, 降低过高的细胞凋亡率, 减轻 Hp 对胃上皮细胞的损害。

[关键词] 益气清热方; I 型幽门螺杆菌; 裸鼠; 胃黏膜; p53; bcl-2

Effect of Yiqi Qingre Formula on p53 and bcl-2 Expression of Gastric Mucosa in Nude Mice Infected with *Helicobacter Pylori* Type I
LU Weimin, WU Jing, SHEN Hong, YANG Xuewen, ZHU Xuanxuan, LI Kejuan, ZHU Changle, SHAN Zhaowei
(Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing 210029)

ABSTRACT Objective To observe the intervention effect and mechanism of Yiqi Qingre Formula (Formula for replenishing qi and clearing heat) on infection of *helicobacter pylori* (Hp) type I. **Methods** Totally 100 male nude mice were randomized into normal control group, model group, Huangqi (*Astragalus membranaceus*) group, Huangqin (*Radix scutellariae*) group, and Yiqi Qingre Formula group, 20 in each. The normal control group and the model group were given normal saline, while the others groups were given the corresponding drug 0.2ml/10g respectively. On the fourteenth day, all mice except those of the normal control group, were given 10^8 cfu/ml Hp liquid intragastrically, 1.3ml for each day. At the end of the second week, they were killed and the p53 and bcl-2 expression of gastric mucosa was observed. **Results** The p53 and bcl-2 expression of gastric mucosa was significantly increased in nude mice with Hp type I infection ($P < 0.01$), while it was markedly reduced in Huangqi group, Huangqin group, and Yiqi Qingre Formula group in comparing with the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Among the three indicated groups, Yiqi Qingre Formula group was the most effective one. **Conclusion** Yiqi Qingre Formula has an inhibitory effect on the p53 and bcl-2 expression of gastric mucosa in nude mice with Hp type I infection. The functional mechanism of which is possibly that it controls apoptosis genes to reduce abnormal apoptosis rate and maintain normal cellular proliferation process, thus relieving Hp's lesions to gastric epithelial cells.

Keywords Yiqi Qingre Formula (Formula for replenishing qi and clearing heat); *helicobacter pylori* (Hp) type I; nude mice; gastric mucosa; p53 and bcl-2

根据幽门螺杆菌(Hp)是否同时表达细胞毒相关蛋白(CagA)和空泡毒素蛋白(VacA)两种毒力因子, 可将 Hp 分为两型: I 型(高毒力株), 具有 CagA 基因, 表达 CagA 蛋白和 VacA 蛋白; II 型(低毒力株), 不具有 CagA, 不产生 CagA 蛋白和 VacA 蛋白^[1]。前期研究表明^[2-4], 脾胃气虚、胃中热郁是 Hp 感染的病理基础, 益气清热是 Hp 感染的治疗大

法, 根据治疗原则组成的益气清热方对 Hp 有一定的抑杀作用, 但远较西药的根除率低, 而改善临床症状、胃镜征象及胃黏膜组织病理学表现作用显著。本研究观察了益气清热方对 I 型 Hp 感染裸鼠胃黏膜 p53(抗癌基因 p53 表达的蛋白)、bcl-2(B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因表达的蛋白)表达的影响, 拟从细胞凋亡角度探讨其治疗 Hp 感染的机理。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级裸鼠 100 只, 雄性, 体重为 (20 ± 2) g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 合格证号: 中科(沪)动管第 99004 号。实验鼠饲料与垫料均为 SPF 级, 购自江苏省协同医药生物工程责任有限公司, 许可证号: 苏 A 饲生字 2002(009)。小鼠自出生后即饲养于无菌通风橱, 饲料、垫料及饮水均经灭菌处理, 室温 (20 ± 2) °C, 湿度 45%~65%。江苏省中医院实验动物使用许可证号: SYXK(苏)2007-0017。

1.2 药物

黄芪 15g、黄芩 10g、益气清热方(黄芪 15g、炒白术 10g、黄芩 10g、仙鹤草 30g、丹参 10g、降香 3g、神曲 12g) 颗粒均购自江阴天江药业有限公司(批号: 040125)。均采用灭菌蒸馏水配制成含生药 1g/ml 的浓度(经折算为临床用药剂量的 10 倍)。

1.3 Hp 菌株

为本院检验科提供的国际标准 Hp 菌株, 编号为 ATCC49503。

1.4 Hp 培养

将 Hp 菌株接种于含 7% 马血清的琼脂培养板上, 置于 37°C 微需氧环境中(5% O₂、10% CO₂、85% N₂) 培养, 48h 收集细菌, 最后用生理盐水制成 10⁸ cfu/ml 的细菌悬液, 备用。

1.5 动物分组与造模

参考文献[5]方法, 建立 I 型 Hp 裸鼠感染模型。采用随机数字表法将小鼠分为 5 组(正常组、模型组、黄芪组、黄芩组、益气清热方组), 每组 20 只, 正常组及模型组每日给生理盐水灌胃, 其余各组灌胃给药, 灌胃容量均为每天 0.2ml/10g。实验第 14 天, 除正常组外, 其余各组给予 10⁸ cfu/ml 的 Hp 菌液灌胃, 每天 1.3ml, 灌胃前禁食禁水 24h, 两周后禁食, 次日处死, 无菌取出胃。实验过程中, 黄芪组及益气清热方组裸鼠各死亡 3 只。

1.6 免疫病理学检查及图像分析

将胃置于 10% 中性甲醛液中, 固定 24h 后, 按要求取材, 脱水, 石蜡包埋, 4μm 切两片, 免疫病理采用 S-P 法。抗体 p53(MAB-0142)、bcl-2(MAB-0014)及 S-P 试剂盒均为美国 Zymed 公司产品, 所有抗体均为即用型抗体。切片经常规脱蜡、水化后, 用 3% 的过氧化氢去除内源性酶, 0.4% 胃蛋白酶消化。DAB 显色, 苏木素衬染, 用 PBS 液代替第一抗体作阴性对照, 用已知的阳性标本切片作阳性对照。

p53 蛋白棕色颗粒位于胞核内, bcl-2 蛋白以腺上皮细胞核膜、胞浆出现棕色颗粒为阳性。

每张切片随机抽取 5 个 400 倍不重复视野, 用 Miniseel. 0 病理图像采集系统进行图像采集, 宁蒗病理图像分析系统 V2.0(江苏康克新柏公司)对染色强度进行定量分析。测定阳性细胞的面密度(目标面积/统计场面积)、积分光密度(阳性目标积分光密度的总和: 该部位所在区域内所有像素点的 OD 值总和), 求出每组标本的平均面密度与平均积分光密度, 两者越高, 说明透光度高, 染色强度高。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 计量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠胃黏膜 p53 表达比较

表 1、图 1 示, 与正常组比较, 模型组胃黏膜 p53 表达显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪、黄芩与益气清热方组能显著降低 p53 的表达($P < 0.01$), 而 3 个药物组间比较, 益气清热方组明显为优($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠胃黏膜 p53 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	面密度	积分光密度($\times 10^6$)
正常组	20	0.75 ± 0.31	1.67 ± 0.52
模型组	20	6.49 ± 0.31*	7.56 ± 0.55*
黄芪组	17	2.47 ± 0.81△#	3.58 ± 0.64△#
黄芩组	20	2.82 ± 0.54△#	2.64 ± 0.35△#
益气清热方组	17	1.18 ± 0.37△	2.04 ± 0.34△

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$; 与益气清热方组比较, # $P < 0.01$

2.2 各组小鼠胃黏膜 bcl-2 表达比较

表 2、图 2 示, 与正常组比较, 模型组胃黏膜 bcl-2 表达显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪、黄芩与益气清热方组能显著降低 bcl-2 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 3 个药物组间比较, 益气清热方组明显为优($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠胃黏膜 bcl-2 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	面密度	积分光密度($\times 10^6$)
正常组	20	24.77 ± 5.90	2.62 ± 0.27
模型组	20	62.89 ± 3.72*	5.88 ± 0.33*
黄芪组	17	48.03 ± 5.35△#	4.78 ± 0.57△△#
黄芩组	20	31.89 ± 2.03△△#	3.35 ± 0.40△△#
益气清热方组	17	25.16 ± 1.63△△	2.61 ± 0.56△△

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与益气清热方组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

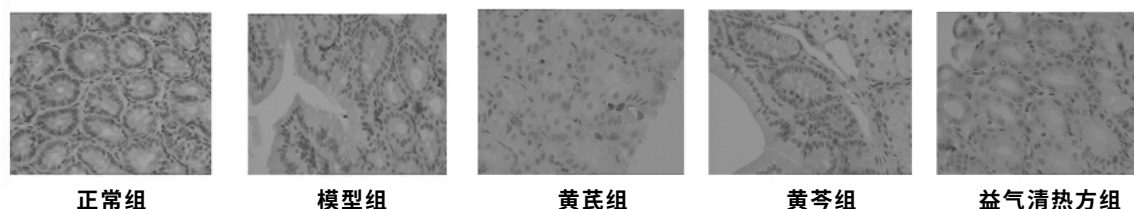


图 1 各组小鼠胃黏膜 p53 表达比较(×400)

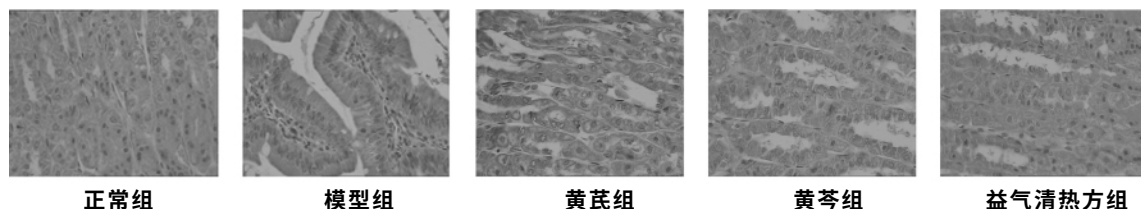


图 2 各组小鼠胃黏膜 bcl-2 表达比较(×400)

3 讨论

细胞凋亡是受基因调控的一种生理性死亡, p53、bcl-2 基因是重要的凋亡调控基因。细胞凋亡异常与包括肿瘤在内的一系列胃肠疾病的发生有关。研究发现, Hp 可导致患者的胃上皮细胞凋亡增加^[6], 在根除 Hp 感染成功的患者, 细胞凋亡指数可恢复正常^[7]。胃上皮细胞凋亡增加将打破细胞增殖与细胞丢失之间的平衡, 使胃黏膜细胞的数量不断减少, 可能导致胃黏膜萎缩或溃疡。但研究也显示, 凋亡细胞增加的同时, 增殖细胞的数量也增加^[8], 尽管细胞增殖可能是维持组织完整性的重要的生理反应, 但由于增生细胞的基因组具有不稳定性, 就有可能使新产生的细胞发生某种基因变异, 最终可能导致组织的异型增生, 甚至肿瘤的形成。

益气清热方在裸鼠体内对 I 型 Hp 有一定的抑杀作用, 并可削弱 I 型 Hp 感染后的致病性, 减轻胃黏膜的炎性渗出, 降低其对胃黏膜上皮细胞的损伤作用^[5]。本研究结果显示, 经 I 型 Hp 感染后的裸鼠胃黏膜 bcl-2 及突变型 p53 蛋白的表达均增高, 黄芪组、黄芩组及益气清热方组均能抑制 bcl-2、p53 的表达, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 3 个药物组间比较, 益气清热方组明显为优 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。益气清热中药可能通过对凋亡基因的调控, 降低过高的细胞凋亡率, 维持细胞正常的生长过程, 减轻 Hp 对胃上皮细胞的损害而达到治疗目的, 而益气(黄芪)与清热(黄芩)中药配伍, 则可能有协同增效之功。既往研究显示^[6], 经益气清热方治疗后, 患者的临床症状、胃镜及组织病理学检查均有显著改善, 提示中医药治疗 Hp 感染的机制不是局限在单纯的抑杀作用,

而对机体免疫功能、基因调控、细胞凋亡及增殖等多方面、多环节的影响, 更值得进一步探讨。本研究仅从细胞凋亡的角度探讨了益气清热方对 I 型 Hp 感染的治疗作用, 存在一定的局限性, 而细胞的凋亡与增殖密不可分。此外, 益气清热方对 I 型 Hp 致病性是否有“减毒增效”作用, 也值得深入研究, 这对中医药临床治疗 Hp 感染具有一定的启示意义。

参考文献

- [1] 潘秀珍, 陈明红. 幽门螺杆菌的毒力研究与分型[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(5): 551-553.
- [2] 陆为民, 潘琳, 吴静. 体质学说对中医药治疗幽门螺杆菌感染的启示[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(32): 3432-3435.
- [3] 陆为民, 沈洪, 吴静, 等. 益气清热方对 I 型幽门螺杆菌感染裸鼠胃黏膜组织病理学的影响[J]. 中医杂志, 2009, 50(7): 646-648.
- [4] 陆为民, 单兆伟, 杨学文, 等. 仁术健胃颗粒对慢性萎缩性胃炎患者幽门螺杆菌及其 cagA 基因的影响[J]. 天津中医药, 2003, 20(1): 26-29.
- [5] 郭刚, 邹全明, 鲁东水, 等. CagA+幽门螺杆菌裸鼠感染模型的建立[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(4): 6-8.
- [6] 王爱鱼, 张晓君, 王永福, 等. 幽门螺杆菌与胃黏膜细胞凋亡的关系[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008, 16(3): 159-161.
- [7] 朱莉, 靳蓉, 王鸿娟, 等. 儿童 CagA+幽门螺杆菌感染根治前后胃黏膜上皮细胞增殖、凋亡和 p53 蛋白水平表达的对比研究[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(2): 126-129.
- [8] 黄赞松. 幽门螺杆菌致胃上皮细胞增殖和凋亡的分子机制研究进展[J]. 右江医学, 2005, 33(4): 413-415.

(收稿日期: 2010-11-01; 修回日期: 2011-05-03)

[编辑: 行之]