

胃得安片对应激性胃损伤模型大鼠胃功能及胃组织中EGF、EGFR表达的影响

毕云生^{1*},徐建江¹,李允江²,张淑瑜¹,于燕莉^{1#}(1.济南军区总医院药剂科,济南 250031;2.山东中医药大学药学院,济南 250355)

中图分类号 R285;R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3528-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.20

摘要 目的:研究胃得安片对应激性胃损伤模型大鼠胃功能及胃组织中表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)表达的影响,探讨其治疗胃溃疡的作用机制。方法:将大鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性组(盐酸雷尼替丁,0.015 mg/kg)和胃得安片高、中、低剂量组(1.7、0.87、0.43 g/kg),每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均采用空腹冷水游泳法复制胃溃疡模型。成模后,各组大鼠每天ig给药1次,连续2周。记录大鼠于给药第0、7、14天时的体质量;末次给药12 h后,检测大鼠的胃液分泌量、胃液pH值、胃溃疡面积及胃黏膜损伤指数,并检测胃组织中EGF、EGFR的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠给药第7、14天时的体质量及胃液pH值降低,胃液分泌量和胃溃疡面积增加,胃黏膜损伤指数升高,胃组织中EGF、EGFR表达增强,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,除胃得安片中剂量组大鼠给药第7天时的体质量、胃液分泌量、胃液pH值、胃溃疡面积以及胃得安片低剂量组大鼠给药第7、14天时的体质量、胃液分泌量、胃液pH值、胃溃疡面积改善和胃组织中EGF表达增强不显著外,其余各给药组大鼠上述指标均显著改善,且胃组织中EGF、EGFR表达持续增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$);胃得安片的作用呈现一定的量效关系。结论:胃得安片能够显著改善应激性胃损伤模型大鼠的胃功能;其机制可能与增强胃组织中EGF、EGFR表达,从而促进溃疡愈合有关。

关键词 胃得安片;胃溃疡;表皮生长因子;表皮生长因子受体;大鼠

Effect of Weide'an Tablet on Gastric Function and the Expressions of EGF and EGFR in Gastric Tissue of Model Rats with Stress-induced Gastric Injury

BI Yunsheng¹, XU Jianjiang¹, LI Yunjiang², ZHANG Shuyu¹, YU Yanli¹ (1.Dept. of Pharmacy, General Hospital of Jinan Military Region, Jinan 250031, China; 2.School of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects Weide'an tablet on gastric function and the expressions of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) in gastric tissue of model rats with stress-induced gastric injury, and investigate its mechanism in the treatment of gastric ulcer. **METHODS:** Rats were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), positive group (ranitidine hydrochloride, 0.015 mg/kg) and Weide'an tablet high-dose, medium-dose, low-dose groups (1.7, 0.87, 0.43 g/kg), 10 in each group. Except for normal group, rats in other groups were given fasting swimming in cold water to induce gastric ulcer model. After modeling, all rats were intragastrically administrated once a day, for 2 weeks. The body mass of rats in 0, 7, 14 d of administration was recorded. After 12 h of last administration, gastric juice secretion, gastric juice pH, gastric ulcer area and gastric mucosal damage index of rats were detected, and the expressions of EGF and EGFR in gastric tissue were detected. **RESULTS:** Compared with normal group, body mass and gastric juice pH in 7, 14 d in model group were declined; gastric juice secretion and gastric ulcer area were increased, gastric mucosal damage index was increased; and the expressions of EGF and EGFR in gastric tissue were enhanced, with statistical significances ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, except that the body mass, gastric juice secretion, gastric juice pH and gastric ulcer area in Weide'an medium-dose group in 7 d, and body mass, gastric juice secretion, gastric juice pH, gastric ulcer area and the expression of EGF in gastric tissue in Weide'an low-dose group in 7, 14 d were not significantly improved, above indexes were significantly improved in other administration groups ($P<0.05$ or $P<0.01$); and the effect of Weide'an tablet showed a certain dose-effect relationship. **CONCLUSIONS:** Weide'an tablet can significantly improve the gastric function of model rats with stress-induced gastric injury; and the mechanism may be related with enhancing the expressions of EGF and EGFR and promoting ulcer healing.

* 副主任药师,硕士。研究方向:中药药效物质基础。电话:0531-51665173。E-mail:jnbys@163.com

通信作者:主任药师,硕士生导师,硕士。研究方向:中药制剂、中药药效物质基础。电话:0531-51666293。E-mail:yuyanli323@sohu.com

KEYWORDS Weide'an tablet; Gastric ulcer; Epidermal growth factor; Epidermal growth factor receptor; Rats

胃得安片为我院(济南军区总医院)研制的中药制剂,由白术、苍术、茯苓、黄连、陈皮、槟榔等25味中药组

成,具有健脾和胃、消食止痛等功效。在我院20多年的临床应用结果证明,其对慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等疾病疗效显著。笔者前期研究发现,胃得安片能够显著升高应激性胃溃疡模型大鼠胃组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、减少胃组织中丙二醛(MDA)含量、维持血清中一氧化氮(NO)含量、抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性、降低胃黏膜细胞过氧化损伤^[1];同时,其又能够增加前列腺素E₂(PGE₂)含量、增加胃黏膜血液供应、促使上皮细胞再生、保护黏膜细胞、增强胃黏膜屏障防御能力^[2]。本研究通过观察胃得安片对应激性胃溃疡模型大鼠体质量、胃液分泌量、胃液pH值、胃黏膜溃疡面积及胃黏膜组织中促进溃疡愈合的重要调节因子——表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)表达的影响,为进一步阐明胃得安片对胃溃疡的治疗作用机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BS124S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);UV-2550紫外分光光度计(日本岛津公司);TGL-16G-A冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Bio-Rad680酶标仪(美国Bio-Rad Laboratories公司);BX53荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社);PHS-3C pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司雷磁仪器厂)。

1.2 药品与试剂

胃得安片(我院药剂科,批号:20141021,规格:0.46 g/片);盐酸雷尼替丁胶囊(江西汇仁药业有限公司,批号:1411146,规格:0.15 g/粒);氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号:1411143602,规格:250 mL:2.25 g);兔抗EGF、EGFR一抗(美国Bio-World Technology公司,批号:P00533、P01133);生物素标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京中杉金桥生物工程有限公司,批号:ZB-2301);二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉晶美生物工程有限公司,批号:AR1022)。

1.3 动物

健康Wistar大鼠70只,♂,体质量180~220 g,购自山东大学实验动物中心[实验动物许可证号:SCXK(鲁)2013-0009]。

2 方法

2.1 分组与给药

健康Wistar大鼠购入后于温度为24~27℃、湿度为50%~65%、自然光照条件下以标准普通饲料稳定饲养1周,期间自由饮食。然后将70只大鼠随机分为正常组(10只)和造模组(60只)。造模组大鼠禁食不禁水12 h,使呈空腹饥饿状态,然后将大鼠浸于(20±1)℃水槽中20 h,模拟出饥饿、疲劳、寒邪、恼怒刺激状态,以复制应激性胃溃疡大鼠模型^[3-4]。造模组大鼠造模过程中死亡5只,从剩余55只造模成功的大鼠中筛选50只随机分为5

组,分别为模型组、阳性组和胃得安片高、中、低剂量组,每组10只。正常组和模型组大鼠ig等体积生理盐水;胃得安片高、中、低剂量组大鼠ig胃得安片1.7、0.87、0.43 g/kg(分别相当于人体正常剂量的2、1、0.5倍,生理盐水溶解);阳性组大鼠ig盐酸雷尼替丁0.015 mg/kg(相当于人体正常剂量的等效剂量,生理盐水溶解),每天给药1次,连续2周,每周称大鼠体质量。

2.2 指标检测

2.2.1 一般状态和体质量 密切观察各组大鼠日常活动和进食、饮水情况,并记录给药第0、7、14天后大鼠的体质量。

2.2.2 胃液分泌量和胃液pH值 末次给药12 h后,大鼠ip 10%水合氯醛0.3 mL/100 g麻醉,剖取完整胃组织,称胃组织质量,收集胃液;然后沿胃大弯剪开,用生理盐水冲洗胃黏膜表面液体,滤纸拭干胃组织表面液体,再次称量胃组织质量,两次称量的差值即为胃液分泌量。随后采用pH计测定胃液pH值。

2.2.3 胃黏膜损伤病理状况及胃溃疡面积、胃黏膜损伤指数 肉眼观察溃疡病灶部位的黏膜损伤情况。用游标卡尺测量溃疡的长径(mm)和短径(mm),计算胃溃疡面积[胃溃疡面积(mm²)=π×长径半径×短径半径]和胃黏膜损伤指数(病灶长度<1 mm,记为1分;1 mm≤病灶长度<2 mm,记为2分;2 mm≤病灶长度<3 mm,记为3分;3 mm≤病灶长度<4 mm,记为4分;若病灶长度>4 mm,则分段计分;最后以全胃溃疡得分总和作为该大鼠胃黏膜损伤指数^[5])。

2.2.4 胃组织中EGF和EGFR表达测定 切取溃疡边缘约3 mm的组织块,大小约为1.0 cm×1.2 cm(正常组大鼠取胃前壁近幽门处组织),然后用10%中性甲醛固定,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 μm连续切片,备用。采用免疫荧光染色法检测胃组织中EGF、EGFR表达。一抗分别滴加兔抗EGF、EGFR抗体(1:100),37℃孵育1.5 h;二抗分别滴加生物素标记的山羊抗兔IgG二抗(1:1 000),37℃孵育1 h。以磷酸盐缓冲溶液(PBS)代替一抗为阴性对照,置荧光显微镜下观察胃组织中EGF、EGFR表达情况,采集荧光图片,导入Image Pro Plus 6.0软件分析图片荧光斑点表达情况,若核膜、胞浆着棕黄色则为阳性细胞。

2.3 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 t 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态观察和体质量测定结果

给药过程中各组大鼠的进食、饮水情况均较好,未出现死亡现象。造模组大鼠呈现出精神萎靡、皮毛无光泽、活动迟缓等状态。随着给药次数的增加,给药组大

鼠的症状逐渐改善。与正常组比较,模型组大鼠给药第7、14天的体质量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠体质量均有不同程度的升高,其中阳性组、胃得安片高剂量组大鼠给药第7、14天的体质量和胃得安片中剂量组大鼠给药第14天的体质量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且胃得安片的作用呈现一定的量效关系,结果见表1。

表1 各组大鼠给药第0、7、14天时的体质量测定结果($\bar{x}\pm s,n=10,g$)

Tab 1 Determination results of body mass of rats in 0, 7, 14 d of administration in each group($\bar{x}\pm s,n=10,g$)

组别	剂量,mg/kg	第0天	第7天	第14天
正常组		198.3±8.5	221.8±10.8	245.3±11.5
模型组		185.2±7.6	161.3±6.4**	172.8±9.1*
阳性组	0.015	186.7±6.8	215.8±8.1 ^{##}	236.8±10.3 ^{##}
胃得安片高剂量组	1.7	187.3±7.2	213.4±7.8 ^{##}	229.5±8.6 ^{##}
胃得安片中剂量组	0.87	185.8±6.5	201.7±7.9	218.9±7.5 ^{##}
胃得安片低剂量组	0.43	187.9±8.3	196.4±6.9	205.3±8.8

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal group,* $P<0.05$,** $P<0.01$; vs. model group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

3.2 胃液分泌量和pH值测定结果

与正常组比较,模型组大鼠胃液分泌量显著增加、pH值显著降低($P<0.01$);与模型组比较,阳性组和胃得安片高剂量组大鼠胃液分泌量显著减少、pH值显著升高($P<0.01$),结果见表2。

表2 各组大鼠胃液分泌量及胃液pH值测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 2 Determination results of gastric juice secretion amount and pH of rats in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量,mg/kg	胃液分泌量,g	胃液pH值
正常组		0.35±0.07	4.82±0.81
模型组		1.15±0.26**	2.38±0.45**
阳性组	0.015	0.52±0.13 ^{##}	4.58±0.51 ^{##}
胃得安片高剂量组	1.7	0.63±0.12 ^{##}	4.14±0.37 ^{##}
胃得安片中剂量组	0.87	0.81±0.22	3.62±0.47
胃得安片低剂量组	0.43	0.92±0.38	2.98±0.53

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal group,** $P<0.01$; vs. model group,^{##} $P<0.01$

3.3 胃黏膜损伤病理观察及胃溃疡面积、胃黏膜损伤指数测定结果

正常组大鼠胃黏膜光滑细腻,呈现淡红色,黏膜皱襞明显,无充血,无出血点;造模组大鼠胃内出现暗红色血性物质,胃黏膜表面出现大面积弥漫性水肿,部分胃黏膜脱落,可见点状或条索状溃疡面及出血点,其中以模型组大鼠最为显著、出血点分布最广泛。给予药物治疗后,大鼠胃内暗红色物质减少,黏膜水肿、充血明显减轻,出血点及溃疡面分布减少。与正常组比较,模型组

大鼠胃溃疡面积显著增加($P<0.01$)、胃黏膜损伤指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性组和胃得安片高剂量组大鼠胃溃疡面积显著减小($P<0.01$),各给药组大鼠胃黏膜损伤指数均显著降低($P<0.01$),且胃得安片的作用呈现一定的量效关系,结果见表3。

表3 各组大鼠胃溃疡面积和胃黏膜损伤指数测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 3 Determination results of gastric ulcer area and ulcer index of rats in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量,mg/kg	胃溃疡面积,mm ²	胃黏膜损伤指数
正常组		0	0
模型组		51.18±8.32**	18.4±2.27**
阳性组	0.015	20.16±6.25 ^{##}	12.6±3.85 ^{##}
胃得安片高剂量组	1.7	25.32±7.75 ^{##}	11.3±2.93 ^{##}
胃得安片中剂量组	0.87	30.17±6.72	12.8±3.39 ^{##}
胃得安片低剂量组	0.43	38.25±5.23	15.2±2.74 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal group,** $P<0.01$; vs. model group,^{##} $P<0.01$

3.4 胃组织中EGF、EGFR表达测定结果

正常组大鼠胃组织中EGF、EGFR表达显示为弱阳性,主要集中在壁细胞、颈部细胞的细胞质部位。与正常组比较,模型组大鼠胃组织中EGF、EGFR表达均显著增强($P<0.01$);与模型组比较,阳性组与胃得安片高、中剂量组大鼠胃组织中EGF、EGFR表达及胃得安片低剂量组大鼠胃组织中EGFR表达均显著增强,呈强阳性表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见图1、表4。

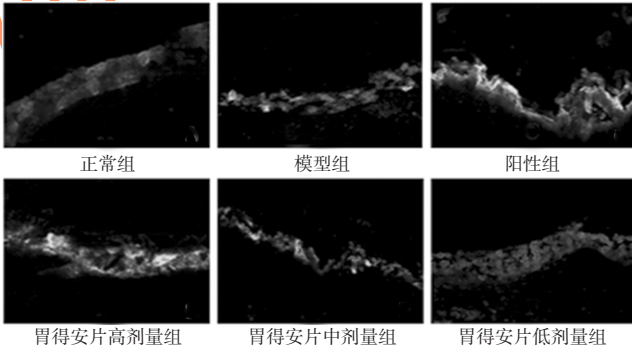


图1 各组大鼠胃组织病理切片图(免疫荧光染色,×200)

Fig 1 Pathological map of gastric tissue of rats in each group (Immunofluorescent staining,×200)

4 讨论

应激性胃溃疡多是应激刺激诱发的以炎性糜烂、浅表性溃疡甚至出血为特征的急性胃黏膜病变。中医认为机体出现过度劳累、耗气伤津、气血亏虚的状态时,药物、酒精、辛辣、生冷等外邪极易入侵胃黏膜,产生刺激而导致发生应激性病变。另外,肝脾失和、情志不畅也会导致胃溃疡病变^[6]。保护胃黏膜、减少胃液分泌量、降低胃液酸度、修复受损胃黏膜、维持胃黏膜屏障作用,是防治胃溃疡的有效措施^[7]。雷尼替丁是H₂受体拮抗药,能够竞争性阻断组胺与H₂受体结合、抑制胃酸分泌,同

时能够降低胃蛋白酶活性、促进胃黏膜修复^[8],故本研究以其为阳性对照。

表 4 各组大鼠胃组织中 EGF、EGFR 的表达测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Determination results of expressions of EGF and EGFR in gastric tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	EGF	EGFR
正常组		0.23±0.02	0.27±0.05
模型组		0.35±0.04**	0.41±0.07**
阳性组	0.015	0.56±0.05 ^{##}	0.61±0.05 ^{##}
胃得安片高剂量组	1.7	0.59±0.06 ^{##}	0.58±0.04 ^{##}
胃得安片中剂量组	0.87	0.45±0.05 ^{##}	0.49±0.07 ^{##}
胃得安片低剂量组	0.43	0.41±0.05	0.45±0.04 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $P<0.05$,^{##} $P<0.01$
Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,
^{##} $P<0.01$

通过对大鼠胃黏膜的观察和胃液分泌量、胃液 pH 值的测定,发现高剂量胃得安片能有效地减少胃液分泌、升高胃液 pH 值,从而降低损害因素水平,促进胃溃疡的修复、愈合。这一结论在统计溃疡面积和胃黏膜损伤指数的结果中也得到了证实,即给予胃得安片后,胃溃疡模型大鼠胃黏膜水肿、充血现象明显减轻,出血点及溃疡面分布显著减少,胃黏膜损伤指数显著降低。

现代研究认为,消化性溃疡是胃黏膜损害因素与防御因素之间的平衡被破坏而导致的,其中损害因素主要包括胃酸、胃蛋白酶、幽门螺杆菌、非甾体类消炎药、酒精、胆汁反流及炎症介质等;防御因素包括胃黏膜-黏液屏障、重碳酸盐、磷脂、黏膜血流、细胞更新、EGF 等^[9]。EGF 是一种由 53 个氨基酸组成的具有生物活性的多肽,广泛存在于消化道内,起到保护胃黏膜免受损伤因子破坏、调节黏膜上皮细胞更新和保护胃、肠黏膜完整等重要作用。然而 EGF 要发挥生物效应必须与其受体 EGFR 结合,才可以刺激上皮细胞的增殖和迁移,参与黏膜的修复和溃疡的愈合^[10-11]。因此,检测胃组织中 EGF、EGFR 表达也可以作为评价消化性溃疡愈合质量的重要指标之一。

通过免疫荧光染色图片可知,阳性组和胃得安片高剂量组大鼠胃组织中 EGF、EGFR 表达均呈较强阳性,空白组大鼠胃组织中 EGF、EGFR 表达均呈弱阳性,其中

EGF、EGFR 的表达均具有同步性,提示胃得安片能增加溃疡模型大鼠胃黏膜组织中 EGF、EGFR 表达,促进胃黏膜上皮细胞更新、提高防御因素水平、促进胃黏膜的修复,从而保护胃黏膜的完整性。

综上所述,胃得安片可通过减少胃液分泌量、升高胃液 pH 值,上调胃黏膜组织中 EGF、EGFR 表达,从而调控胃溃疡上皮细胞的再生修复、促进损伤后胃黏膜的愈合,这可能是其治疗大鼠胃溃疡的作用机制之一。

参考文献

[1] 毕云生,李允江,杨文超,等.胃得安片对应激性胃溃疡模型大鼠的保护作用[J].中国药房,2015,26(19):2654-2657.

[2] 毕云生,李允江,路其康,等.胃得安片对大鼠应激性胃溃疡作用机制的初步研究[J].解放军药理学学报,2015,31(3):215-217.

[3] 谢田.胃溃疡实验动物模型制作方法的研究进展[J].中国伤残医学,2014,22(10):309-310.

[4] 徐晶晶,黄萍,吴清和,等.胃疡宁丸抗实验性胃溃疡的药效及机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(5):736-739.

[5] 陈艳,王盛丰,沈欢欢,等.元胡总碱对实验性大鼠胃黏膜损伤的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2015,29(5):825-830.

[6] 王莹,丁世兰,齐学洁,等.应激性胃溃疡发病机制与中医药治疗的研究进展[J].天津中医药,2013,30(3):186-189.

[7] 张琪,梁海业,陈世新,等.基于 Keap1-Nrf2-ARE 通路维持黏膜屏障完整探讨舒胃汤防治胃溃疡的研究[J].现代中西医结合杂志,2016,25(13):1395-1401.

[8] 腾康忠,杨军.奥美拉唑与雷尼替丁治疗上消化道溃疡并出血的临床效果对比观察[J].临床合理用药杂志,2015,8(7A):60-61.

[9] 胡伏莲.消化性溃疡发病机理和治疗新理念[J].医学与哲学(临床决策论坛版),2010,31(5):13-15.

[10] 贺建华,罗和生.生长因子在消化性溃疡愈合中的作用[J].国外医学消化系统疾病分册,2003,23(1):13-15.

[11] 李俊青,李纯,刘希,等.参七消痞颗粒对慢性萎缩性胃炎大鼠血清 GH,EGF,GAS 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):172-175.

(收稿日期:2017-02-20 修回日期:2017-05-24)
(编辑:林 静)