

安胃汤对幽门螺旋杆菌阳性萎缩性胃炎模型大鼠保护作用的药理探索

吴德坤¹, 唐友明¹, 郑景辉¹, 曾家耀², 吕丽容²(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001)

摘要: **目的** 探讨安胃汤对幽门螺旋杆菌(HP)阳性萎缩性胃炎的治疗效果及作用机制。**方法** 用幽门螺旋杆菌感染联合水杨酸钠、乙醇灌胃的方法复制幽门螺旋杆菌阳性萎缩性胃炎大鼠模型, 模型复制成功后随机将大鼠分为模型组、阳性对照组(幽门螺旋杆菌标准四联组)及安胃汤低、中、高剂量组, 每组 10 只, 另取 10 只正常大鼠作为对照组, 给药 30 d。检测胃蛋白酶活性及胃液分泌量; 免疫发光法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)水平; 酶联免疫吸附法检测血清胃蛋白酶原 I(PG I)、胃蛋白酶原 II(PG II)、胃泌素(GAS)水平; HE 染色观察胃组织病理变化及胃组织幽门螺旋杆菌阳性情况; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹(Western Blot)法检测胃组织腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP1)、血管内皮生长因子 C(VEGF-C)mRNA 和蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠胃蛋白酶活性降低, 胃液分泌量减少($P < 0.01$); 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显上升($P < 0.01$); PG I / PG II 和 GAS 含量明显降低($P < 0.01$); 幽门螺旋杆菌阳性率明显增加($P < 0.01$); 胃组织 AMPK mRNA、蛋白表达明显降低, SREBP1、VEGF-C mRNA 蛋白表达明显增加($P < 0.01$); 大鼠胃黏膜层腺体数量明显减少, 细胞萎缩破裂, 出现大量空泡, 有明显的炎症反应。与模型组比较, 安胃汤各剂量组及阳性对照组大鼠胃蛋白酶活性提高, 胃液分泌量增加($P < 0.01$); 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显降低($P < 0.01$); PG I / PG II 和 GAS 含量明显升高($P < 0.01$); 安胃汤中、高剂量组及阳性对照组幽门螺旋杆菌阳性率明显降低($P < 0.01$); 胃组织 AMPK mRNA、蛋白表达明显增加, SREBP1、VEGF-C mRNA 蛋白表达明显减少($P < 0.01$); 大鼠胃黏膜层腺体数量明显增加, 炎细胞浸润减少。**结论** 安胃汤可增加慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃液分泌量和胃蛋白酶活性, 抑制炎症因子水平及活性氧生成, 其作用机制可能与调控 AMPK、SREBP1、VEGF-C 表达相关。

关键词: 安胃汤; 幽门螺旋杆菌(HP); 萎缩性胃炎; 作用机制; 大鼠; AMPK; SREBP1; VEGF-C

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)01-0057-07

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2022.01.009

Pharmacologic Study of Anwei Decoction on the Protection of Atrophic Chronic Gastritis Rats with Helicobacter Pylori Positive

WU Dekun¹, TANG Youming¹, ZHENG Jinghui¹, ZENG Jiayao², LYU Lirong²(1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011 Guangxi, China; 2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001 Guangxi, China)

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of Anwei decoction on atrophic gastritis with helicobacter pylori positive (HP). **Methods** Rat models of atrophic chronic gastritis with helicobacter pylori positive (Hp CAG model) were established by Hp infection combined with gavage of sodium salicylate and ethanol. Rats were randomly divided into the model group (normal saline), Anwei decoction low-, medium-, high-dose groups and positive control group (Hp standard quadruple group) after Hp CAG model were successfully replicated, 10 rats in each group. Another 10 normal rats were taken as the blank control group (normal saline). Each group was medicated for 30 days. Gastric juice secretion, pepsin activity and serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 were measured. Gastrin (GAS),

收稿日期: 2021-03-24

作者简介: 吴德坤, 女, 副教授, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病的实验研究。Email: 1278323777@qq.com。通信作者: 唐友明, 男, 主任医师, 研究方向: 消化系统疾病临床与实验研究。Email: Tang530011@163.com。

基金项目: 广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198111); 广西壮族自治区中医药管理局项目(20210718)。

serum pepsinogens I and II (PG I, PG II) levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay. Gastric histopathological changes were observed by HE staining. HP positive rate was detected by HP assay. The mRNA and protein expressions of adenosine monophosphate activated kinase (AMPK), sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) and vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in gastric tissues were detected by RT-PCR and Western Blot. **Results** Compared with the control group, the activity of pepsin and gastric juice secretion were decreased in the model group ($P < 0.01$). The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were significantly increased ($P < 0.01$). GAS content and PG I/PG II ratio were significantly decreased ($P < 0.01$). HP positive rate was significantly increased ($P < 0.01$). The mRNA and protein expressions of AMPK were significantly decreased, while the mRNA and protein expressions of SREBP1 and VEGF-C were significantly increased ($P < 0.01$). The number of gastric mucosal glands in rats was significantly reduced, the cells were atrophied and ruptured, large number of vacuoles appeared, and obvious inflammatory reactions occurred. Compared with the model group, the activity of pepsin and the secretion of gastric juice in *Anwei* decoction groups were increased ($P < 0.01$). The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum were significantly decreased ($P < 0.01$). PG I/PG II ratio and GAS content were increased significantly ($P < 0.01$). The positive rate of HP in *Anwei* decoction medium-, high-dose groups was significantly decreased ($P < 0.01$). The mRNA and protein expressions of AMPK were significantly increased, and the mRNA and protein expressions of SREBP1 and VEGF-C were significantly decreased ($P < 0.01$). Moreover, the number of gastric mucosal glands in rats increased significantly, inflammatory cell infiltration was reduced. **Conclusion** *Anwei* decoction can increase gastric juice secretion and pepsin activity in CAG rats, inhibit the level of inflammatory factors and the generation of reactive oxygen species, which may be achieved by regulating the expression of AMPK, SREBP1 and VEGF-C.

Keywords: *Anwei* decoction; helicobacter pylori (HP); atrophic gastritis; mechanism; rats; AMPK; SREBP1; VEGF-C

慢性萎缩性胃炎(Chronic atrophic gastritis, CAG)是一种临床较常见的慢性胃部疾病,主要病理特征为固有腺体萎缩及胃黏膜的慢性炎症^[1]。幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)感染是引起慢性萎缩性胃炎的重要因素,流行病学调查结果^[2]显示,慢性胃炎中有60%~80%患者幽门螺旋杆菌显示阳性。由于幽门螺旋杆菌具有黏附性、运动性强等特点,所以极易产生抗生素耐药,治疗存在一定困难。

安胃汤是广西名中医林寿宁教授在全国名老中医林沛湘教授治疗慢性胃病用药基础上组方而成的^[3]。方中半夏和胃降逆,燥湿开结,消痞除满;黄连泻火解毒;干姜温中逐寒;百合清泻胃腑之邪热;乌药顺气开郁,散寒止痛;甘草酸甘化阴以生津液,柔肝缓急而止疼病;薏苡仁清热健脾。诸药合用,寒热并施,辛开苦降,具有祛瘀止痛、行气化湿、消痞健胃、平调寒热的功效,临床治疗脾胃病效果明显^[4-5],但其内在机制尚未研究清楚。

炎症反应是幽门螺旋杆菌相关性慢性胃炎病理反应的重要因素,腺苷酸活化蛋白激酶(Adenosine

monophosphate activated protein kinase, AMPK)是调节能量代谢的关键分子^[6]。有研究^[7]显示 AMPK 对炎症反应有一定的抑制作用。固醇调节元件结合蛋白1 (Sterol regulatory element binding protein 1, SREBP1)是肝脏内脂质代谢的主要转录因子。有研究^[8]报道,过表达的 SREBP1 也具有促炎作用。血管内皮生长因子 C (Vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)是促淋巴管生成因子。研究证实^[9]高表达 VEGF-C 与胃癌的发生紧密相关,但其在慢性胃炎等疾病中的研究鲜有。

本研究以幽门螺旋杆菌阳性萎缩性胃炎大鼠为模型,探索安胃汤对幽门螺旋杆菌阳性慢性萎缩性胃炎的治疗作用,旨在从分子水平和细胞信号转导通路角度,揭示安胃汤作用于幽门螺旋杆菌阳性萎缩性胃炎的内在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60只SD大鼠,SPF级,8周龄,体质量(200±20)g,雌雄各半,购于广东省医学实验动

物中心, 动物许可证号: SCXK 粤 2016-0005, 动物质量合格证号: 44002100015360。采用架式笼养, 在(25±1)℃恒温、50%~60%湿度、每小时自动通风 8~15 次的条件下饲养。实验经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准, 伦理审查证书编号: DW20210909-127。实验过程中对动物的处置符合实验动物使用的伦理学原则。

1.2 药物及试剂 安胃汤中药饮片, 由广西中医药大学附属瑞康医院药剂科提供, 包括: 半夏、黄连、干姜、百合、白芍、乌药、丹参、薏苡仁、炙甘草, 其构成比为 13:5:5:20:20:7:15:10:5。使用时每剂药物加蒸馏水 10 倍量, 浸泡 30 min, 武火煮 3 min, 然后文火继续煎煮至 30 min 结束, 用纱布过滤药液, 药渣继续加蒸馏水 10 倍量, 重复煎煮 2 次; 合并滤液, 水浴挥发浓缩, 制备成 0.55、1.1、2.2 g·mL⁻¹ 的安胃汤溶液, 4℃冰箱贮存备用。奥美拉唑胶囊, 万邦德制药集团股份有限公司, 规格: 每粒 20 mg, 批号: C10B180819; 阿莫西林胶囊, 石药集团中诺药业(石家庄)有限公司, 规格: 每粒 0.25 g, 批号: 9C050103; 胶体果胶铋胶囊, 浙江昂利康制药股份有限公司, 规格: 每粒 0.1 g, 批号: 8T1H20; 克拉霉素分散片, 扬子江药业集团有限公司, 规格: 每片 0.25 g, 批号: H999037; 甲硝唑, 规格: 每片 200 mg, 远大医药(中国)有限公司, 批号: 190322; 吡哆美辛, 规格: 每片 25 mg, 山西云鹏制药有限公司, 批号: D190101; 水杨酸钠, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20190521; 75%乙醇, 广西北仑河医科工业集团有限公司, 批号: 20190601; 肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1β (IL-1β) 试剂盒, 南京凯基生物科技有限公司, 批号: 190415、190624、190813; 胃蛋白酶测试盒, 南京建成生物工程研究所, 批号: A003-1-2; 大鼠胃蛋白酶原 I (Pepsinogen I, PG I)、胃蛋白酶原 II (Pepsinogen II, PG II)、胃泌素 (Gastrin, GAS) 试剂盒, 武汉贝茵莱生物科技有限公司, 批号: 201805、201802、201806; AMPK、SREBP1、VEGF-C、GAPDH 抗体, 美国 Bioworld 公司, 货号: BS1289、BS91433、BS56172、BS31826; BCA 蛋白定量试剂盒, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 批号: 23227。

1.3 仪器 Sorvall Stratos 低温高速离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; X73 倒置荧光显微镜, 日本

OLYMOUS 公司; BSA224S 分析天平, 美国 METTLER TOLEDO 公司; GelDoc XR+ 凝胶成像系统, 美国 BIO-RAD 公司;

1.4 大鼠幽门螺旋杆菌阳性萎缩性胃炎模型^[10]制备

随机取 50 只大鼠, 用 2%阿莫西林+2.5%甲硝唑混合液清除胃内杂菌, 6.6 mL·kg⁻¹, 每日 1 次, 共 3 d; 第 4 天灌胃 2%吡哆美辛水溶液, 破坏胃黏膜屏障, 3.3 mL·kg⁻¹, 每日 1 次, 共 2 d; 第 6 天灌胃 2 mL 50 g·L⁻¹ 碳酸氢钠溶液, 15 min 后灌胃 1 mL 幽门螺旋杆菌悬液(幽门螺旋杆菌培养 72 h, 用生理盐水冲洗成菌悬液, 比浊法调整菌量为 1×10¹² CFU·L⁻¹), 每 2 d 1 次, 共 6 次。间隔 28 d 后灌胃 2 mL 水杨酸钠和乙醇混合溶液(2 g 水杨酸钠溶于 60%的乙醇溶液 100 mL 中配制而成), 每天 1 次, 连续 8 周; 灌胃前禁食 12 h、灌胃 4 h 后进食。模型复制成功判断标准为: 光镜下显示胃黏膜固有腺体减少^[11]。

1.5 分组和给药 模型复制中未出现大鼠死亡, 经光镜判定所有大鼠均符合模型判定标准。将模型复制成功的大鼠随机分为模型组、阳性对照组(幽门螺旋杆菌标准四联组)及安胃汤低、中、高剂量组, 每组 10 只, 另取 10 只正常大鼠作为对照组。安胃汤低、中、高剂量组大鼠每天每只给予 0.55、1.1、2.2 g·kg⁻¹ 的安胃汤溶液灌胃; 阳性对照组大鼠每天每只给予四联组所需生药量 0.291 6 g·kg⁻¹ (奥美拉唑胶囊 0.003 6 g·kg⁻¹、胶体果胶铋胶囊 0.036 g·kg⁻¹、阿莫西林胶囊 0.18 g·kg⁻¹、克拉霉素片 0.072 g·kg⁻¹); 对照组及模型组每天给予 4 mL 生理盐水, 灌胃给药, 连续给药 30 d。

1.6 胃液分泌量及胃蛋白酶活性测定 末次给药结束后, 禁食 24 h, 腹腔注射 10%水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹) 麻醉。大鼠仰位固定, 使头部位置高于胃部, 剖腹后于幽门下 0.3 cm 结扎; 5 h 后剪开结扎处, 收集胃液, 以 4℃、4 000 r·min⁻¹ (离心半径 10 cm) 离心 15 min; 测量上清液体积; 取 2 mL 上清液, 以 4℃、13 000 r·min⁻¹ (离心半径 10 cm) 离心 10 min; 取上清液, 测定胃蛋白酶活性。

1.7 血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量及 PG I、PG II、GAS 水平检测 大鼠胃液收集完毕后, 腹主动脉采血。以 4℃、3 500 r·min⁻¹ (离心半径 10 cm) 离心 15 min, 取血清, 免疫发光法检测 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量; 酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 PG I、PG II 及 GAS 水平, 并计算 PG I/PG II 比值。操作方法严格

按照试剂盒说明书进行。

1.8 胃黏膜组织病理学检查 腹主动脉取血后, 摘出全胃, 沿胃大弯剪开, 用生理盐水冲洗胃黏膜, 于胃窦部及部分胃体、胃壁分别取 3 mm×10 mm 大小胃黏膜组织, 10% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 切片, HE 染色, 光镜下观察病理变化和幽门螺旋杆菌阳性情况; 取一小块胃窦黏膜组织, 保存于-80 ℃冰箱, 用于 AMPK、SREBP1、VEGF-C mRNA 及蛋白检测。

1.9 RT-PCR 法检测胃黏膜组织 AMPK、SREBP1、VEGF-C mRNA 表达 按照试剂盒说明书提取胃黏膜组织总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明进行逆转录反应。PCR 反应条件: 95 ℃, 45 s; 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 40 s, 进行 45 个循环。每组进行 3 次测定, 取平均值, 图像分析仪扫描凝胶密度, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 表达水平。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成, 见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列表

Table 1 Primer sequence table of RT-PCR

引物	引物序列
AMPK	上游 5'-TGAGAAGCAGAAGCAGACG-3' 下游 5'-TTCTCCAATCTTCACTTTGCGG-3'
SREBP1	上游 5'-CCATGGACGAGCTACCCCTTC-3' 下游 5'-GCATGTCTTCGATGTCGGTA-3'
VEGF-C	上游 5'-ACATGATTCTTCGATGTCGG-3' 下游 5'-TGTCATCCATGGCGAACTGT-3'
GAPDH	上游 5'-CGCGAGTACAACCTTCTTGC-3' 下游 5'-CGTCATCCATGGCGAACTGG-3'

1.10 Western Blot 法检测胃黏膜组织 AMPK、SREBP1、VEGF-C 蛋白表达 取大鼠胃黏膜组织, 加入 RIPA 裂解液, 匀浆后, 以 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ (离心半径 10 cm) 离心 15 min, BCA 蛋白定量法测定上清液蛋白浓度; 加上样缓冲液和 RIPA 制备样品; 上样量为 100 μg 蛋白, 经电泳、转膜、脱脂、封闭后, 加入一抗 AMPK (1:1 000)、SREBP1 (1:500)、VEGF-C (1:500)、GAPDH (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗涤, 加入二抗, 室温孵育 2 h; TBST 洗涤, ECL 显影并扫描, 化学发光仪成像。

1.11 统计学方法 用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析, 计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$), 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠胃液分泌量及胃蛋白酶活性 见表 2。与对

照组比较, 模型组大鼠胃蛋白酶活性明显降低, 胃液分泌量明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 安胃汤各剂量组及阳性对照组大鼠胃蛋白酶活性明显升高, 胃液分泌量增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 安胃汤对幽门螺旋杆菌 (HP) 阳性慢性萎缩性胃炎 (CAG) 大鼠胃蛋白酶活性及胃液分泌量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of Anwei decoction on pepsin activity and gastric juice secretion of HP-positive chronic atrophic gastritis (CAG) rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	胃液分泌量/mL	胃蛋白酶活性/(U·mg ⁻¹)
对照组	0.63 ± 0.03	19.17 ± 2.91
模型组	0.24 ± 0.02**	7.52 ± 0.72**
安胃汤低剂量组	0.31 ± 0.02**	9.68 ± 0.93**
安胃汤中剂量组	0.41 ± 0.02**	13.87 ± 1.17**
安胃汤高剂量组	0.56 ± 0.03**	17.43 ± 1.52**
阳性对照组	0.58 ± 0.04**	19.05 ± 1.64**

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$

2.2 大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量 见表 3。与对照组比较, 模型组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 安胃汤各剂量组及阳性对照组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 3 安胃汤对幽门螺旋杆菌 (HP) 阳性慢性萎缩性胃炎 (CAG) 大鼠 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of Anwei decoction on TNF-α, IL-1β and IL-6 contents of helicobacter pylori (HP) positive chronic atrophic gastritis (CAG) rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照组	247.37 ± 11.91	32.05 ± 3.41	53.68 ± 4.71
模型组	593.18 ± 31.25**	99.47 ± 8.63**	77.65 ± 5.45**
安胃汤低剂量组	526.21 ± 28.64**	74.80 ± 6.62**	72.95 ± 6.33**
安胃汤中剂量组	385.54 ± 19.27**	57.73 ± 4.27**	65.15 ± 4.14**
安胃汤高剂量组	274.93 ± 12.70**	45.87 ± 3.75**	56.14 ± 4.52**
阳性对照组	263.28 ± 15.40**	41.16 ± 4.21**	54.37 ± 4.63**

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$

2.3 大鼠血清 PG I/PG II 及 GAS 水平 见表 4。与对照组比较, 模型组大鼠血清 PG I/PG II、GAS 含量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 安胃汤各剂量组及阳性对照组大鼠血清 PG I/PG II、GAS 含量均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 大鼠胃黏膜 HE 染色结果 见图 1。与对照组比

较, 模型组大鼠胃黏膜腺体厚度变薄, 腺体数量明显减少, 细胞萎缩破裂, 出现大量空泡, 有明显的炎性细胞浸润; 安胃汤中剂量组大鼠腺体数量明显恢复, 腺体厚度明显增加, 炎细胞浸润减少; 安胃汤高剂量及阳性对照组无明显炎细胞浸润, 腺体数量及胃黏膜层厚度基本恢复正常。

2.5 大鼠胃黏膜幽门螺旋杆菌阳性率 见表 5。与对照组比较, 模型组大鼠幽门螺旋杆菌阳性率明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 安胃汤中、高剂量组及阳性对照组大鼠幽门螺旋杆菌阳性率均明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

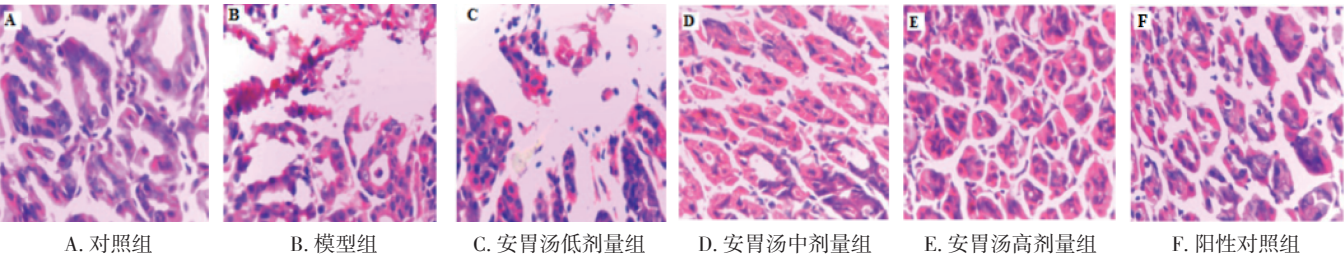


图 1 各组胃黏膜 HE 染色结果($\times 400$)

Figure 1 HE staining of gastric mucosa in each group

表 5 安胃汤对幽门螺旋杆菌(HP)阳性慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠 HP 阳性率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effects of *Anwei* decoction on HP positive rate of helicobacter pylori(HP) positive chronic atrophic gastritis(CAG) rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	HP 阳性率/%
对照组	1.30 $\pm$ 0.08
模型组	65.34 $\pm$ 5.90 ^{**}
安胃汤低剂量组	56.19 $\pm$ 4.60
安胃汤中剂量组	43.24 $\pm$ 3.50 ^{##}
安胃汤高剂量组	19.73 $\pm$ 1.30 ^{##}
阳性对照组	17.39 $\pm$ 1.10 ^{##}

注: 与对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$

2.6 大鼠胃组织中 AMPK、SREBP1、VEGF-C mRNA 表达 见图 2。与对照组比较, 模型组大鼠 AMPK mRNA 表达明显降低, SREBP1、VEGF-C mRNA 表达明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 安胃汤各剂量组及阳性对照组大鼠胃组织 AMPK mRNA 表达明显增加, SREBP1、VEGF-C mRNA 表达均明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

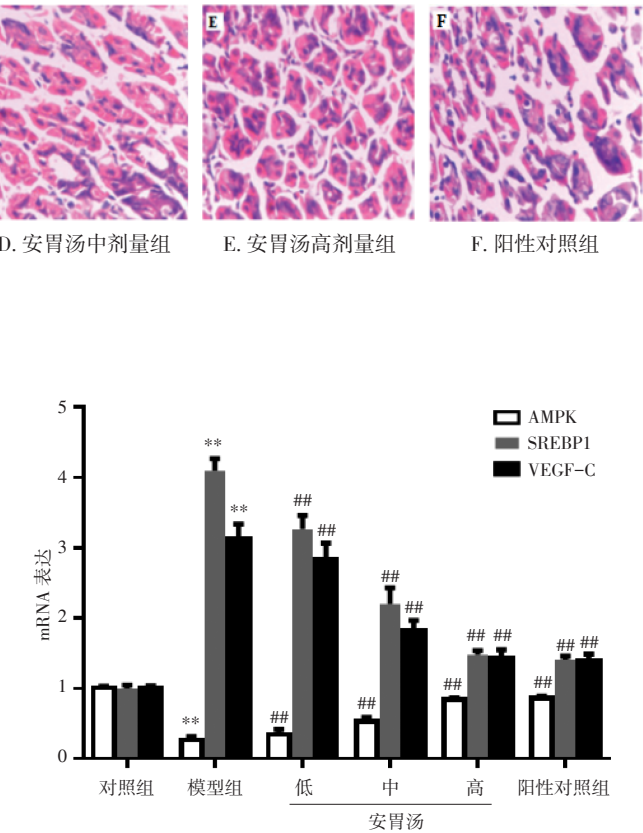
2.7 大鼠胃组织中 AMPK、SREBP1、VEGF-C 蛋白表达 见图 3。与对照组比较, 模型组大鼠 AMPK 蛋

表 4 安胃汤对幽门螺旋杆菌(HP)阳性慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠 PG I/PG II、GAS 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effects of *Anwei* decoction on PG I/PG II and GAS levels of helicobacter pylori (HP) positive chronic atrophic gastritis(CAG) rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	PG I/PG II	GAS/(ng·L ⁻¹)
对照组	6.28 $\pm$ 0.62	98.25 $\pm$ 9.64
模型组	4.36 $\pm$ 0.33 ^{**}	54.88 $\pm$ 4.64 ^{**}
安胃汤低剂量组	4.83 $\pm$ 0.35 ^{##}	66.96 $\pm$ 5.39 ^{##}
安胃汤中剂量组	5.29 $\pm$ 0.42 ^{##}	83.87 $\pm$ 6.69 ^{##}
安胃汤高剂量组	6.15 $\pm$ 0.59 ^{##}	94.38 $\pm$ 8.54 ^{##}
阳性对照组	6.22 $\pm$ 0.61 ^{##}	96.33 $\pm$ 8.82 ^{##}

注: 与对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$

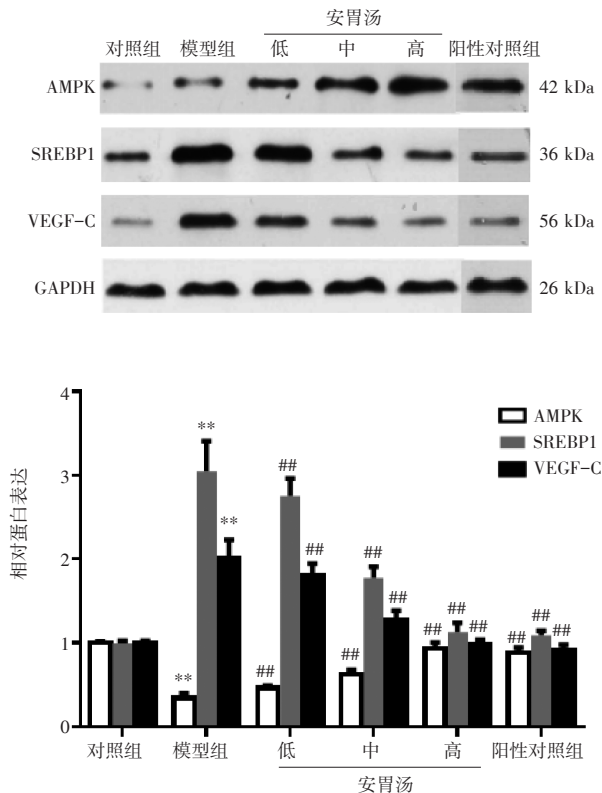


注: 与对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$

图 2 安胃汤对幽门螺旋杆菌(HP)阳性慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠 AMPK、SREBP1、VEGF-C mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 2 Effects of *Anwei* decoction on mRNA expressions of AMPK, SREBP1 and VEGF-C of helicobacter pylori (HP) positive chronic atrophic gastritis(CAG) rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

白表达明显降低, SREBP1、VEGF-C 蛋白表达明显增加, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 安胃汤各剂量组及阳性对照组大鼠胃组织中 AMPK 蛋白表达明显增加, SREBP1、VEGF-C 蛋白表达明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图3 安胃汤对幽门螺旋杆菌(HP)阳性慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠 AMPK、SREBP1、VEGF-C 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 3 Effects of *Anwei* decoction on protein expression of AMPK, SREBP1 and VEGF-C of helicobacter pylori(HP) positive chronic atrophic gastritis(CAG) rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3 讨论

慢性萎缩性胃炎(CAG)的发生因素较为混杂,其中幽门螺旋杆菌(HP)感染是最主要的一个原因^[12]。本研究采用改良多因素刺激方法复制幽门螺旋杆菌阳性萎缩性胃炎大鼠模型,在接种幽门螺旋杆菌前,灌胃抗生素抑杀大鼠胃内正常菌群,降低胃内菌群免疫防护作用,灌胃吡哆美辛削弱胃黏膜防御修复功能。此方法复制的慢性萎缩性胃炎大鼠模型过程与人类慢性萎缩性胃炎发病途径相似,幽门螺旋杆菌感染率高,幽门螺旋杆菌定植时间较长。此方法已经较为广泛地用于建立幽门螺旋杆菌阳性慢性萎缩性胃炎大鼠模型。姚金锋等^[13]采用此方法建立了幽门螺旋杆菌长期感染大鼠模型。

目前,西医在治疗幽门螺旋杆菌阳性慢性萎缩性胃炎以对症治疗及根除幽门螺旋杆菌为主。首次治疗主要采用标准四联疗法,根除率较高,但根除失败的患者再次应用标准四联疗法进行补救治疗效果

较差,其原因可能与患者对抗生素产生耐药有关。此外,不少患者经治疗后仍有腹胀、早饱、嗝气、纳差,甚至脘腹顿痛等症状,复发率较高。

中医将慢性萎缩性胃炎归属于“胃脘痛”“痞满”“反酸”“嘈杂”等范畴,主要病因为外感六淫邪气、内伤饮食、情志郁结等因素导致中焦气机不利、脾胃升降失调。安胃汤的应用遵循了中医学整体观念,以辨病与辨证相结合,在辨证论治基础上预防和治疗慢性萎缩性胃炎,在改善慢性萎缩性胃炎患者临床症状、降低病情复发率等方面取得了较好的临床疗效,且长期使用无耐药性^[14]。现代药理研究^[15]显示,安胃汤能改善慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃黏膜的炎症反应,促进腺体的再生,增加微循环血流,促进局部胃黏膜的修复。

慢性萎缩性胃炎患者由于胃黏膜腺体的萎缩,导致其胃液分泌量明显减少,并进一步影响胃蛋白酶活性^[16]。本研究中安胃汤可明显增加慢性萎缩性胃炎大鼠的胃液分泌量,改善其胃蛋白酶活性。炎症反应是幽门螺旋杆菌相关性慢性胃炎病理反应中的关键过程,当幽门螺旋杆菌进入胃内后,会引起胃黏膜上皮细胞的骨架重组及酪氨酸磷酸化,激活核因子- κ B,从而促进中性粒细胞和 TNF- α 、白细胞介素类等诸多炎症因子的大量释放,导致机体发生炎症反应^[17-19]。本研究中安胃汤可明显降低慢性萎缩性胃炎大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的含量,改善胃黏膜的炎症反应。胃蛋白酶原是胃黏膜消化腺分泌的一种消化酶前体,分为 PG I 和 PG II 两个亚群,PG 水平可以很好地反应胃体黏膜的泌酸功能,胃体萎缩时会影响 PG I 的分泌情况^[20];胃泌素(GAS)是由胃以及十二指肠 G 细胞分泌的多肽类激素,可促进胃酸分泌,对胃肠道黏膜具有很好的保护和营养作用,慢性萎缩性胃炎患者胃分泌功能的下降,导致 GAS 分泌减少,胃黏膜失去了保护和营养作用,因此, GAS 含量也可以反映胃黏膜萎缩的情况^[21]。本研究中安胃汤中、高剂量可明显增加 PG I / PG II 比值和 GAS 含量,改善胃黏膜的萎缩情况。

AMPK 为能量代谢的调节因子,近年来的研究^[22]还显示活化的 AMPK 多种细胞中促炎细胞因子的合成及分泌具有抑制作用,如巨噬细胞中的 IL-6、IL-1 β ;另外一些细胞因子也可以反馈调节 AMPK 活性。SREBP1 在肝脏中表达丰富,研究^[23]显示过表达的 SREBP1 具有促炎作用,同时炎症反应亦能上调 SREBP1 的表达,进而促进脂质沉积,导致脂代谢紊

乱。VEGF-C 为一种淋巴管生成因子,近年来诸多研究^[24]显示 VEGF-C 高表达与胃癌的发生密切相关。王锐等^[25]研究报道:在胃黏膜肠上皮化生及上皮内瘤变中幽门螺旋杆菌阳性组 VEGF 表达量高于幽门螺旋杆菌阴性组。本研究中模型组大鼠胃组织中 AMPK 表达明显降低, SREBP1、VEGF-C 表达明显增加,说明模型组大鼠胃组织存在明显的炎症反应;给予安胃汤干预后,大鼠胃组织 AMPK 表达明显增加, SREBP1、VEGF-C 表达明显降低,提示安胃汤可通过调节 AMPK、SREBP1、VEGF-C 表达降低胃黏膜炎症反应,缓解慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜损伤。

综上所述,安胃汤可增加慢性萎缩性胃炎大鼠胃液分泌量和胃蛋白酶活性,抑制炎症因子水平,其作用机制可能与调控 AMPK、SREBP1、VEGF-C 表达相关,后期会进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 郭敏,李佃贵.化浊解毒治萎方对Hp阳性慢性萎缩性胃炎患者血清PG I/PG II的影响[J].环球中医药,2016,9(11):1293-1296.
- [2] 万俊华,尹晓华,叶红梅,等.养胃颗粒对慢性胃炎患者胃黏膜炎症及幽门螺旋杆菌的影响[J].中药药理与临床,2015,31(6):162-164.
- [3] 朱永钦,朱永革,林寿宁,等.安胃汤防治慢性萎缩性胃炎的方药机制探讨[J].辽宁中医杂志,2017,44(3):644-646.
- [4] 林寿宁.中国百年百名中医临床家丛书:林沛湘[M].北京:中国中医药出版社,2001:9.
- [5] 廖冬燕,朱永革,张学宁,等.安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎疗效与安全性观察[J].广西中医药,2015,38(1):12-15.
- [6] 赛庆彬,马延超,朱荣.有氧运动抑制心力衰竭大鼠心脏脂质沉积:AMPK-PPAR α 信号通路的作用[J].中国运动医学杂志,2012,31(12):1081-1086,1108.
- [7] 王世英,赵欣欣,时军,等.AMPK过表达抑制姥鲛烷诱导的狼疮鼠中肾小球系膜细胞增生和基质合成及炎症反应[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(11):1479-1485.
- [8] 徐健强,王燕,盘艳君,等.冠心病患者固醇调节元件结合蛋白-1与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白1炎性体相关性研究[J].中国循环杂志,2018,33(3):227-230.
- [9] 苗莹莹,仇玮,王建宁,等.胃癌中幽门螺杆菌感染与VEGF-C、VEGF R-3 表达的关系[J].临床肿瘤学杂志,2016,21(8):708-711.
- [10] 唐旭东,张翠萍,张琪,等.改良式 Hp感染萎缩性胃炎大鼠模型的建立[J].青岛大学医学院学报,2012,48(3):247-249.
- [11] 房静远,杜奕奇,刘文忠,等.中国慢性胃炎共识意见(2017年,上海)[J].中华消化杂志,2017,37(11):721-738.
- [12] 刘晓政,罗冲,尚品杰,等.萎缩性胃炎病理改变与幽门螺杆菌感染的相关性研究[J].中华医院感染学杂志,2015,7(3):554-555,558.
- [13] 姚金锋,崔东来,姚希贤,等.大鼠幽门螺杆菌感染慢性萎缩性胃炎模型的研究世界华人消化杂志[J].2020,8(8):892-895.
- [14] 朱永革,吴承芳,李岸平,等.安胃汤治疗功能性消化不良寒热错杂证的临床观察[J].辽宁中医杂志,2019,46(12):2561-2564.
- [15] 朱永革,林寿宁,韦维,等.安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎的疗效及对EGFmRNA的影响[J].广西中医药,2012,35(2):8-11.
- [16] 惠文佳,周春艳,刘卫东,等.血清胃蛋白酶原检测与胃镜检查对慢性萎缩性胃炎临床诊断价值的比较[J].检验医学,2017,32(3):169-172.
- [17] TAKEUCHI H, ISRAEL D A, JRR M P, et al. Effect of Helicobacter pylori cdr A on interleukin-8 secretions and nuclear factor kappa B activation[J]. World Journal of Gastroenterology, 2012, 18(5):425-434.
- [18] CHA B, LIM J W, KIM H. Jak1/Stat3 is an upstream signaling of NF- κ B activation in Helicobacter pylori- induced IL-8 production in gastric epithelial AGS cells[J]. Yonsei Medical Journal, 2015, 56(3):862-866.
- [19] PERRAIS M, ROUSSEAUX C, DUCOUROUBLE M P, et al. Helicobacter pylori urease and flagellin alter mucin gene expression in human gastric cancer cells[J]. Gastric Cancer, 2014, 17(2):235-246.
- [20] 朱琦,熊华,张尧,等.Hp相关性胃病患者Hp根除后血清胃泌素及胃蛋白酶原水平变化及临床意义[J].中国医学前沿杂志电子版,2016,8(2):35-38.
- [21] 朱春平,赵建业,申晓军,等.血清胃泌素-17联合胃蛋白酶原检测对胃癌诊断价值的多中心临床研究[J].中华消化内镜杂志,2017,34(1):19-23.
- [22] GALIC S, FULLERTON M D, SCHERTZER J D, et al. Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity[J]. J Clin Invest, 2011, 121:4903-4915.
- [23] 柏灵灵,赵蕾,李青,等.炎症上调固醇调节元件结合蛋白1致C57BL/6J小鼠肝脏脂质积聚[J].重庆医科大学报,2013,38(4):346-349.
- [24] 陈美霓,郭浩,郭巍,等.COX-2蛋白和VEGF-C蛋白在胃癌和非胃癌黏膜病变组织中的表达及临床意义[J].海南医学,2015,26(1):2671-2674.
- [25] 王锐,高会斌,于永强,等.根除幽门螺杆菌对肠上皮化生和上皮内瘤变VEGF表达的影响[J].浙江临床医学,2015,17(10):1658-1660.

(编辑:修春)