

黄芩素对慢性萎缩性胃炎大鼠胃粘膜保护作用的实验研究※

● 田 华¹ 王小平^{1▲} 张峰利²

摘 要 目的:从抑制慢性炎症反应的角度探讨黄芩素对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠胃粘膜的保护机制。方法:SD 大鼠随机分为空白对照组、模型对照组、维酶素阳性对照组、黄芩素高(200mg·kg⁻¹)、中(150mg·kg⁻¹)、低(50mg·kg⁻¹)剂量干预组,除空白对照组外,各组均 CAG 造模,造模 28 周后开始灌胃给药,连续 10 周后 ELISA 法检测白细胞介素-8(IL-8)含量,免疫组化法检测热休克蛋白 70(HSP70)、核转录因子-κB(NF-κB)和环氧合酶-2(COX-2)的蛋白表达。结果:黄芩素高、中剂量组的大鼠体征状况与空白组相似;黄芩素高、中剂量组能显著降低 CAG 大鼠的 IL-8、NF-κB 和 COX-2 含量,提高 HSP70 含量。结论:黄芩素可能通过降低 CAG 大鼠的 IL-8、NF-κB 和 COX-2 含量从而阻断了慢性炎症对胃粘膜长期、反复的损伤,并通过提高 HSP70 含量使胃黏膜的抗炎性损害能力增强,从而起到预防、治疗慢性萎缩性胃炎的保护作用。

关键词 慢性萎缩性胃炎 黄芩素 白细胞介素-8 热休克蛋白 70 核转录因子-κB 环氧合酶-2

慢性萎缩性胃炎(CAG)是一种常见病、多发病,其发病率居各类消化系统疾病前列。它是多种致病因素长期作用下,以胃粘膜萎缩为主要特征的一种常见的慢性消化系统疾病,临床上主要表现为上腹不适、食纳减少、消瘦乏力等非特异性症状。病理改变可见胃黏膜上皮和固有腺体萎缩,数目减少,黏膜变薄,或伴幽门腺化生、肠腺化生和不典型增生^[1]。若不积极治疗,可发展为胃癌,被认为是一种癌前病变,严重危害健康^[2]。黄芩素为唇形科植物黄芩的主要活性成分之一,属于酚类的抗氧化剂^[3],具有较强的抗炎活性和抗肿瘤作用^[4],有研究发现其对胃癌有一定的抑制作用。本实验主要从抑制慢性炎症反应的角度探讨黄芩素对 CAG 大鼠胃粘膜的保护机制,旨在为中药预防、治疗慢性萎缩性胃炎提供一定的实验依据。

※基金项目 国家自然科学基金项目(No. 81172135)

▲通讯作者 王小平,男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事肿瘤分子免疫病理学研究。E-mail:wxpphd@aliyun.com

•作者单位 1. 陕西中医药大学(712046); 2. 陕西中医药大学第二附属医院(712000)

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雌、雄各半,体重(250±5)g,购自第四军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(军)2009-005]。实验室饲养温度(20±2)℃,所有动物适应性喂养 1 周。

1.2 药品与试剂 黄芩素由陕西中医学院中药制剂设计研究室提供,纯度>98%;(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)购自萨恩化学技术有限公司(批号:MV340-RG);维酶素片购自北海阳光药业有限公司(批号:101120);IL-8 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所(批号:H008);兔抗鼠 HSP70 多克隆抗体(批号:BAO101055)、兔抗鼠 NF-κB 多克隆抗体(批号:BAO101055)、羊抗鼠 COX-2 多克隆抗体(批号:BAO101023)和 DAB 显色剂(批号:SA2023)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 光学显微镜(尼康 DXM1200F 型),倒置显微镜(尼康 TS100 型),低温恒冷切片机(KD-2800 型),台式高速离心机(GENIUS 16K 型),石蜡包埋机(EG1140 型),脱水机(TP1020),烘片机

(ZMN200 型),石蜡切片染色机(5010 型)。

2 方法

2.1 造模 除空白对照组外,其它实验组小鼠用 MNNG 复合法造模^[5]:饥饱失常(每进食 1d,禁食 1d),烫热高盐饮食(禁食日 3pm 用 56℃、15% NaCl 溶液按 10mL·kg⁻¹灌胃),供给 150mg·L⁻¹ MNNG 溶液(代替饮用水),0.03% 雷尼替丁饲料。进行 28 周。

2.2 分组与给药 造模 28 周后,CAG 大鼠随机分成 5 组,即模型对照组、维酶素阳性对照组(200mg·kg⁻¹)、黄芩素 50,150,200mg·kg⁻¹ 组^[6],每组 12 只。每天 9am~10am 给药,连续 10 周。

2.3 大鼠体征观察 观察大鼠毛色、粪便、活动度等一般情况。

2.4 IL-8 检测 取每组大鼠胃组织 100mg,加冰生理盐水 2mL 后匀浆,35000r·min⁻¹ 离心 10min 后取上清液,按试剂盒说明采用 ELISA 方法检测 IL-8。

2.5 NF-κB、COX-2、HSP70 检测 石蜡切片常规脱蜡后,3% H₂O₂ 灭活内源性酶,室温孵育 20min,微波进行抗原修复 10min 后 5% 牛血清封闭。加兔抗大鼠一抗,4℃ 孵育过夜,NF-κB、COX-2、HSP70 1:100 稀释液。以 PBS 代替一抗做阴性对照,以 1% 的 DAB 显色,双蒸水终止反应,苏木精复染,用中性树胶封片。采用免疫组化法测定 NF-κB、COX-2、HSP70 的蛋白含量,通过软件 Image-Proplus6.0 计算平均光密度值(OD)。

2.6 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验进行分析,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠的体征情况 空白对照组大鼠的毛色光

亮,反应灵敏,粪便成形。模型对照组大鼠瘦小,皮毛无光泽,反应迟钝,部分大鼠大便不成形,粪便臭味重。给药 10 周后,黄芩素 150,200mg·kg⁻¹ 组及维酶素阳性对照组大鼠体形较前变胖,皮毛较前光泽度明显提高,活动度增加,反应较前灵敏,粪便较前成形。而黄芩素 50mg·kg⁻¹ 组与模型对照组的大鼠一般情况相似。

3.2 黄芩素对 CAG 大鼠 IL-8 的影响 模型组大鼠 IL-8 含量高于正常组大鼠(*P* < 0.05),黄芩素 150,200mg·kg⁻¹ 组及维酶素阳性对照组 IL-8 值均低于模型组(*P* < 0.05),而黄芩素 50mg·kg⁻¹ 组与模型组的 IL-8 含量无统计学差异(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 黄芩素对 CAG 大鼠 IL-8 的影响($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	IL-8(pg·mL ⁻¹)
空白组	-	3.79 ± 0.65
模型组	-	18.92 ± 1.20 [△]
黄芩素组	50	17.22 ± 2.30 [△]
	150	4.01 ± 0.20 [*]
	200	3.56 ± 1.07 [*]
维酶素组	200	3.98 ± 0.12 [*]

注:与空白组比较[△]*P* < 0.05,与模型组比较^{*}*P* < 0.05。

3.3 黄芩素对 CAG 大鼠 NF-κB、COX-2、HSP70 蛋白表达的影响 模型组大鼠 NF-κB、COX-2 含量均高于正常组(*P* < 0.05)。黄芩素 150,200mg·kg⁻¹ 组及维酶素组 NF-κB、COX-2 含量均低于模型组(均 *P* < 0.05),HSP70 含量高于模型组(*P* < 0.05)。而黄芩素 50mg·kg⁻¹ 组与模型组的 NF-κB、COX-2、HSP70 含量无统计学差异(*P* > 0.05)。见表 2。

表 2 黄芩素对 GAP 大鼠 NF-κB、COX-2、HSP70 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	NF-κB(OD 值)	COX-2(OD 值)	HSP70(OD 值)
空白组	-	9.86 ± 0.36	12.84 ± 1.71	0.42 ± 0.07
模型组	-	21.62 ± 3.11 [△]	47.27 ± 4.1 [△]	0.43 ± 0.12
黄芩素组	50	17.52 ± 1.48	42.13 ± 2.55	0.46 ± 0.92
	150	10.14 ± 1.02 [*]	13.12 ± 0.78 [*]	0.88 ± 0.11 ^{△*}
	200	9.53 ± 1.12 [*]	12.07 ± 2.01 [*]	0.97 ± 0.48 ^{△*}
维酶素组	200	11.06 ± 1.17 [*]	12.98 ± 1.02 [*]	0.89 ± 0.22 ^{△*}

注:与空白组比较[△]*P* < 0.05,与模型组比较^{*}*P* < 0.05。

4 讨论

世界卫生组织 (WHO) 已将慢性萎缩性胃炎定义为癌前状态,其具有一定的癌变率,严重危害人类的健康^[7-9],若能对慢性萎缩性胃炎进行积极治疗,则能阻断其进一步发展为胃癌。该病病因复杂,病机不明,给治疗带来了一定的难度。研究表明,该病是在免疫、遗传、幽门螺杆菌感染 (HP)、饮食不当及滥用药物等因素长期复合作用下^[10],首先引起胃粘膜局部炎症,进而影响到胃粘膜的血运循环,使胃黏膜的屏障遭到了破坏,粘膜固有腺体开始萎缩,粘膜变薄甚至伴有肠上皮的化生、异型增生而最终导致的。

当这些致病因素作用于胃粘膜时,胃粘膜受到刺激后首先释放炎症趋化因子 IL-8,引起局部的炎症反应。这种局部的炎症反应引起胃粘膜发生早期的损伤。炎症因子 IL-8 进一步作用于 NF- κ B,使其表达增强并发生活化。NF- κ B 在炎症反应、免疫调节及细胞的凋亡、分化过程中都具有十分重要的作用^[11]。其中在炎症反应中 NF- κ B 能增加多种炎症细胞因子的表达,IL-8 表达也随 NF- κ B 表达的增多而增多,增多的 IL-8 又可促进 NF- κ B 的进一步活化,从而产生炎症的级联反应,使得炎症反应被不断加强并持续作用,胃粘膜在这种不断加强又持续存在的炎症反应下反复损伤,最终朝着 CAG 的方向发展。另外活化后的 NF- κ B 从胞质转位于胞核,在细胞核内与环氧合酶-2 (COX-2) 的基因启动子特异性结合后使 COX-2 的合成增加,COX-2 是 (PG) 前列腺素合成过程中的重要限速酶。有研究表明,COX-2 蛋白高表达于癌变和癌前病变的组织中,COX-2 主要通过影响前列腺素的合成调控组织的生物学行为,它能加重组织的损伤,降低机体免疫力,引起细胞的增值表达,被认为是组织发生癌变过程中的早期事件^[12]。HSP70 是一类内源性保护蛋白,在早期的炎症反应中即可被细胞因子诱导合成或合成增加,其抗炎作用在临床及动物实验中已被证实^[13]。HSP70 的高表达可以重新激活某些酶以维护细胞的功能,提高细胞对应激原的耐受性,维持粘膜的完整。HSP70 通过竞争进入核孔转运的 NF- κ B 复合体,达到抑制 NF- κ B 活化的目的,进一步阻断炎症因子 IL-8 等过量产生,使 IL-8 与 NF- κ B 的炎症级联放大反应被中断^[14],从而起到抗炎、减轻胃粘膜炎症损伤作用,保护胃黏膜,阻止慢性萎缩性胃炎的发生。

本研究结果提示黄芩素可能通过抑制 IL-8 的释放、减少 NF- κ B 和 COX-2 的合成、增加 HSP70 的合成等环节上阻断了致病因素对胃粘膜的慢性炎症损伤,从而起到对 CAG 的治疗作用,并发现这种作用与黄芩素剂量密切相关,为其临床应用提供了一定的理论基础和实验依据。

参考文献

- [1] Tari A, Kitadai Y, Sumiim M, et al. Basis of decreased risk of gastric cancer in severe atrophic gastritis with eradication of helico - bacter pylori [J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(1) : 232 - 239.
- [2] 唐梅文, 王伟, 李桂贤, 等. 加味七方胃痛颗粒对大鼠实验性萎缩性胃炎胃黏膜组织超微结构的影响 [J]. 新中医, 2010, 42(5) : 105 - 107.
- [3] KAISEROVA H, SIMUNEK T, VAN DER VIJGHW J, et al. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl re - ductase [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772 (9) : 1065 - 1074.
- [4] CHIY S, LIM H, PARK H, et al. Effects of wogonin, a plant flavone from Scutellaria radix, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation - associated gene expression [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(7) : 1271 - 1278.
- [5] 孔祥茹, 杨岩, 李慧臻, 等. MNNG 不同给药剂量及途径对大鼠胃黏膜组织病理学的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 33(6) : 381 - 384.
- [6] 车庆明, 杨琳, 陈颖, 等. 不同剂量黄芩素在大鼠体内的药动学差异 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(8) : 604 - 606.
- [7] 范尧夫, 魏睦新. 胃癌癌前病变的研究进展及防治对策 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(20) : 1807 - 1812.
- [8] 魏小娟, 赵治国, 崔铁. 鸟氨酸脱羧酶和 c - myc 在胃癌和癌前病变组织表达及其临床意义 [J]. 中国实用医刊, 2011, 38(7) : 52 - 54.
- [9] 董平, 吴文广, 丁琦晨, 等. 胃癌与上皮内瘤变差异基因表达谱的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29 : 2183 - 2184.
- [10] Steere NA, Yamaguchi S, Andrews CA, et al. Functional screen of human MCM2 - 7 variant alleles for disease - causing potential [J]. Mutat Res, 2009, 666(1/2) : 74 - 78.
- [11] MARY KAILEH, RANJAN SEN. Role of NF - κ B in the Anti - Inflammatory Effects of Tocotrienols [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2010, 29(3) : 334 - 339.
- [12] HAYDEN M GHOSH S. Shared Principles in NF - κ B signaling [J]. Cell, 2008, 132(3) : 344 - 362.
- [13] XU CZ, DONG P, LI XY, et al. Expression and clinical significance of hypoxia - inducible factor - 1 α and cyclooxygenase - 2 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2009, 44(1) : 57 - 62.
- [14] Wang L, Liu Y, Steinacker JM. Hsp70 response to electrical stimulation in C2C12 cells [J]. Exerc Immunol Rev, 2010, 18 : 91 - 102.