

[文章编号] 1000-4718(2007)04-0749-04

云母对大鼠慢性萎缩性胃炎的预防作用及机制研究*

徐 妙, 姒健敏[△], 王海云

(浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

[摘要] 目的: 研究云母对大鼠慢性萎缩性胃炎的预防作用并探讨其机制。方法: 以 60% 的乙醇、20 mmol/L 的去氧胆酸钠和 0.1% 的氨水在 24 周建立 SD 大鼠慢性萎缩性胃炎模型。在造模的同时用云母进行预防实验。实验终期观察鼠胃黏膜大体观及各项病理学指标, 并检测血清表皮生长因子和生长激素浓度。结果: 云母预防组胃黏膜腺体排列规则, 无明显的萎缩现象; 胃窦部的胃黏膜炎症级别低于模型组 ($P < 0.01$); 胃黏膜腺体厚度 (L1) 和黏膜肌层厚度 (L2) 之比 (L1/L2) 高于模型组 ($P < 0.01$); 单位长度内胃黏膜腺体数目高于模型组 ($P < 0.01$)。与正常组无明显差别 ($P > 0.05$)。胃窦部黏膜增殖细胞核抗原表达阳性的高度及血清表皮生长因子浓度高于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而生长激素浓度与模型组无明显差别。结论: 云母对大鼠慢性萎缩性胃炎的形成有预防作用。减少损伤因子的破坏作用、促进胃黏膜细胞增殖及内源性的表皮生长因子分泌, 可能是其重要作用机制。

[关键词] 云母; 胃炎, 萎缩性; 大鼠; 表皮生长因子; 增殖细胞核抗原

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Prevention of isinglass on the chronic atrophic gastritis in rats and its mechanism

XU Miao, SI Jian-min, WANG Hai-yun

(Sir Run Run Show Hospital Affiliated to Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China. E-mail: Sijm@163.net)

[ABSTRACT] **AIM:** To evaluate the effect of isinglass on chronic atrophic gastritis (CAG) in rats and its mechanism. **METHODS:** An animal model of CAG in accordance with the previous experience of combined administration of 60% ethanol, 20 mmol/L sodium deoxycholate and 0.1% ammonia water was established in SD rats. Isinglass was used as preventive therapy while we were establishing CAG rat model. Finally all the rats were executed and pathologic changes of the gastric mucosa were studied by gross appearance and microscopy and serum epidermal growth factor (EGF) and growth hormone (GH) contents were tested. **RESULTS:** In each isinglass prevention group, inflammation grade of gastric antrum was less than that in model group ($P < 0.01$) while the mean ratio of the thickness of gastric mucosal gland and muscularis mucosa (L1/L2), the number of gastric glands in 1 mm lengths of mucosal layer in longitudinal sections were much better than those in model group ($P < 0.01$). They were very close to normal control group ($P > 0.05$). The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in gastric mucosa and serum EGF level were higher than those in model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), but serum GH content showed no different between isinglass prevention group and model group. **CONCLUSION:** Isinglass prevents the gastric mucosal atrophy in the CAG model. Its mechanism may be related to the effects of decreasing the gastric mucosal damage, promoting the cell proliferation and increasing of internal EGF secretion.

[KEY WORDS] Isinglass; Gastritis, atrophic; Rats; Epidermal growth factor; Proliferating cell nuclear antigen

云母作为中医矿物药之一, 首载于《神农本草经》, 其性能: 甘、平, 入肺、肝、脾经, 有安神、敛疮止血之功效。我院中西医结合消化病专家应用云母治疗慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 及胃癌前病变取得颇佳的临床效果, 为进一步明确其

疗效, 在复制大鼠 CAG 模型的同时, 进行云母预防实验, 至预定阶段取胃黏膜作病理学检查并检测血清表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和生长激素 (growth hormone, GH), 以探讨其可能的作用机制。

[收稿日期] 2005-08-29 [修回日期] 2005-11-12

* [基金项目] 浙江省科技厅自然科学基金资助项目 (No. 011103018); 杭州市科技发展计划资助项目 (No. 2002121A15)

△ 通讯作者 Tel: 0571-87296264; E-mail: Sijm@163.net

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 药物及试剂 氨水:中国瓶窑医药化工试剂厂,批号为20000914,用时配成浓度为0.1%的氨水,分装后做饮用水;乙醇:纯度>99.5%,宜兴市钮家化工助剂厂,批号为20000226,用蒸馏水配成60%的溶液;去氧胆酸钠:Serva公司生产,上海化学试剂采购供应站进口分装经销,批号为980511,用蒸馏水配成20 mmol/L的溶液;蔗糖铝:浙江嘉兴药业,批号为991203,用蒸馏水配成悬浮液;云母:浙江大学医学院附属邵逸夫医院中药制剂中心提供,粉剂,批号为20010315,用蒸馏水配成悬浮液;表皮生长因子、生长激素测定试剂盒由中国原子能公司提供。

1.2 实验动物与CAG模型的建立 7周龄、健康、性成熟、一级质量标准的雌性SD大鼠,体重(200±10)g(浙江大学医学院动物实验中心提供)。全部采用架式笼养,室温为(20±1)℃,湿度50%~60%,光照明暗各12 h交替,单独空调。用0.1%的氨水作为每日饮用水自由饮用;20 mmol/L的去氧胆酸钠每日灌胃1次,每次2 mL;60%的乙醇每周空腹灌胃2次,每次2 mL。上述3因素共处理24周建立鼠CAG模型。

2 方法

2.1 分组及给药 ①正常组7只:不造模,灌服生理盐水;②模型组8只:造模24周,不予云母;以下3组在造模的同时给云母预防,每天灌胃1次;③云母高剂量预防组8只:1.6 mg·g⁻¹·d⁻¹;④云母低剂量预防组8只:0.8 mg·g⁻¹·d⁻¹;⑤蔗糖铝预防组7只:1.6 mg·g⁻¹·d⁻¹。实验时间共24周,实验过程观察大鼠的精神状态、活动情况、毛发光泽度、食欲、大小便情况、体重等。

2.2 标本制备、病理组织学检查 各组大鼠实验到期后,禁食24 h,先抽取颈动脉血每份5 mL,静置2 h后3 500 r/min离心15 min,留取血清,-20℃冰冻保存。然后剖腹暴露全胃,沿胃大弯切开,观察胃黏膜的色泽、弹性、皱壁情况、黏液多少等大体情况。以10%的中性甲醛溶液固定,分别沿小弯侧和大弯侧条状取材,作病理切片,行HE染色作组织学检查及应用PCIO(美国DAKO公司生产,编号为M879)行免疫组化测定增殖细胞核抗原表达情况。

2.3 CAG检测指标 参照1994年美国休斯顿胃炎诊断分类标准,对黏膜层炎症细胞浸润作半定量(0~Ⅲ级)测定;同时应用测微仪测定胃黏膜腺体厚度

(L1)和黏膜肌层厚度(L2)之比(L1/L2)(每张切片测量胃窦部5个视野,取平均值);单位长度的胃腺体数目(以距幽门环200~1 200 μm为一单位长度)。

2.4 胃黏膜增殖指标 在距幽门环(250±50) μm处用测微器测量5个胃窦部腺体PCNA表达阳性的高度,算出平均值,单位用μm表示。

2.5 血清表皮生长因子和生长激素水平的检测 用放射免疫法测血清EGF、GH的水平。严格按说明书操作。

3 统计学处理

上述结果采用完全随机设计资料的方差分析方法(One-way ANOVA)进行分析,应用SPSS 10.0统计软件协助统计。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1 一般情况

模型组的大鼠均有不同程度的恶心、流涎、精神萎靡、食欲差、活动减少,体重增长慢、毛发发黄、光泽度差等。正常组和各预防组活动自如、毛发色白、光泽度好。

2 胃黏膜大体观察

正常组大鼠胃黏膜呈粉红色,有光泽,被覆较多黏液,黏膜皱襞表面光滑,走向规则,胃壁弹性良好。模型组胃壁弹力减弱,黏膜层变薄,色苍白,皱襞变平或走向紊乱,可见不同程度的陈旧性出血点,伴胃窦黏膜点状或灶状糜烂。云母预防组基本接近正常组。蔗糖铝预防组个别可见胃黏膜的充血、水肿及散在出血点。

3 胃黏膜组织学

3.1 组织学改变 正常组大鼠胃黏膜上皮细胞排列整齐,腺体排列紧密规则,胃小凹清晰,除胃窦部可见个别炎症细胞外,其余部位极少见到炎症细胞及充血、水肿。胃窦固有层腺体饱满清晰,与胃小凹分界明显,黏膜肌层较薄(图1)。胃体部固有腺分布规则,壁细胞数量丰富,染色均匀,腺体之间排列紧密,无出血、肠化、增生等现象。模型组胃窦黏膜腺体有不同程度的排列紊乱、稀疏,黏膜肌层增厚,向黏膜固有层伸展呈分枝状插入腺体之间,伴有大量炎症细胞浸润,部分有成堆淋巴细胞聚集灶(图2)。此外还发现胃窦黏膜内有腺体囊样扩张,但未见肠上皮化生、假性幽门腺化生、不典型增生、腺瘤、类癌、腺癌等。云母高低剂量预防组(图3、4)病变轻微,接近于正常对照组。蔗糖铝预防组胃窦部区

域有较多炎细胞浸润。

3.2 各组大鼠胃窦黏膜各项病理指标 云母高低剂量预防组及硫糖铝预防组胃窦部黏膜炎症级别明显低于模型组 ($P < 0.01$); L1/L2 值(胃黏膜腺体厚度 L1 和黏膜肌层厚度 L2 之比)及胃窦部 1 mm 长度内腺体数目明显高于模型组 ($P < 0.01$); 3 者与正常组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 胃窦黏膜炎症级别、L1/L2 值及单位长度的胃腺体数目
Tab 1 Changes of inflammation grades, L1/L2 and the number of gastric glands in 1mm lengths of mucosal layer ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Inflammation grade	L1/L2	The number of gastric glands in 1mm
Normal control	7	0.79 ± 0.21	5.38 ± 0.57	31.86 ± 2.61
Model	8	2.05 ± 0.28 *	2.82 ± 0.55	25.25 ± 3.41
High dose isinglass	8	0.81 ± 0.10 **△	5.08 ± 0.48 **△	32.5 ± 2.93 **△
Low dose isinglass	8	0.84 ± 0.20 **△	5.31 ± 0.37 **△	32.0 ± 3.34 **△
Sucralfate	7	0.85 ± 0.20 **△	5.26 ± 0.48 **△	32.43 ± 2.57 **△

* $P < 0.01$, ** $P > 0.05$ vs normal control group; △ $P < 0.01$ vs model group.

4 PCNA 的表达及血清 EFG 和 GH

云母高低剂量预防组及硫糖铝预防组胃窦部黏膜 PCNA 表达阳性的高度明显高于模型组 ($P < 0.01$); 3 者与正常组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组的血清 EGF 浓度高于正常组 ($P < 0.05$), 而云母高低剂量组及硫糖铝组的血清 EGF 浓度高于模型组 ($P < 0.05$); 各组间血清 GH 浓度无明显差别, 见表 2。

表 2 胃窦黏膜 PCNA 表达阳性的高度及血清 EFG、GH 值
Tab 2 Changes of positive PCNA expression length and EGF, GH contents in serum ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	The length of positive PCNA expression(μm)	EFG (μg/L)	GH (μg/L)
Normal control	7	123.29 ± 5.22	0.61 ± 0.28	18.01 ± 1.60
Model	8	57.14 ± 6.57 **	2.24 ± 0.83 *	18.48 ± 1.23
High dose isinglass	8	129.38 ± 11.86 △△	3.69 ± 1.08 **△	18.10 ± 1.35
Low dose isinglass	8	125.50 ± 8.98 △△	4.04 ± 1.97 **△	17.47 ± 1.46
Sucralfate	7	123.14 ± 6.04 △△	3.65 ± 0.47 **△	17.72 ± 1.61

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs model group.

讨 论

慢性萎缩性胃炎 (CAG) 属胃癌前状态, 其病因主要与 Hp 感染、免疫因素、胆汁反流、乙醇、饮食、吸烟、药物等作用有关。我们综合采用 60% 乙醇、20 mmol/L 去氧胆酸钠和 0.1% 氨水及饥饿失常法即模仿上述常见 CAG 发病因素在 24 周内成功地建立了 CAG 大鼠模型^[1], 从而为研究云母对萎缩性胃

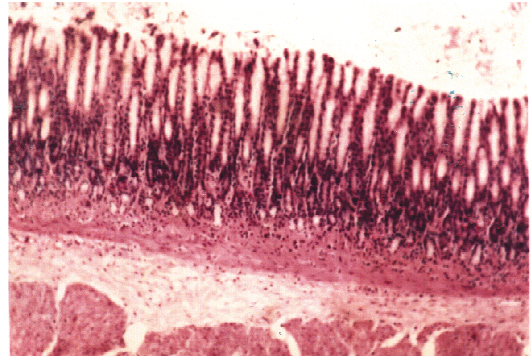


Fig 1 Epithelia arrayed regularly with plentiful mucosal glands in normal group (HE staining, ×100).

图 1 正常组

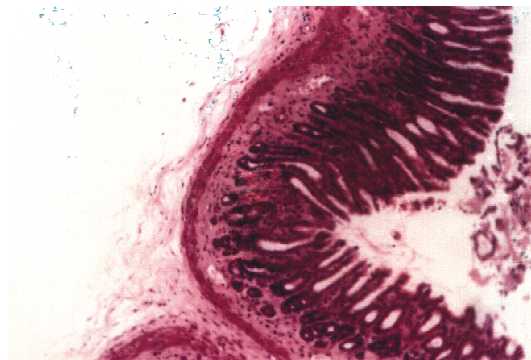


Fig 2 Mucosal glands reduced and arrayed disorderly with plenty of inflammatory cells immersed in model group (HE staining, ×100).

图 2 模型组

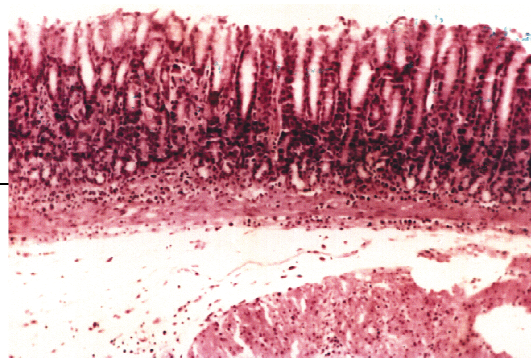


Fig 3 The morphologic structure in high dose isinglass was very close to that of normal group (HE staining, ×100).

图 3 云母高剂量预防组

炎的预防作用提供了可靠的动物模型。

古今医家对云母做过诸多临床观察和研究认为云母有益肺、平喘、止血、敛疮的功效^[2]。本实验证实云母对鼠 CAG 的形成有预防性保护作用。其机制可能同以下几个方面的作用有关: ①阻止理化因子对胃黏膜屏障的损伤。在电镜下我们观察云母具有天然层状结构, 及庞大的表面积, 可以均匀覆盖于胃黏膜表面, 因而它可以吸附、拮抗各种理化损伤因

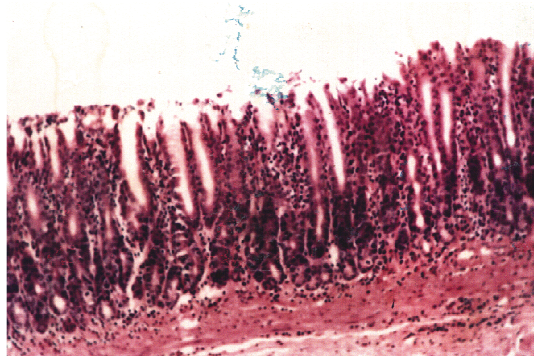


Fig 4 The morphologic structure in low dose isinglass was very close to that of normal group (HE staining, ×100).

图4 云母低剂量预防组

子,从而保护胃黏膜。②促进胃黏膜细胞的生长、组织愈合。PCNA 是由 261 个氨基酸组成的酸性核蛋白,存在于细胞核内,为 DNA 合成酶 δ 的辅助蛋白,是细胞 DNA 合成中不可缺少的因子。其量在静止期细胞很少, G_1 晚期开始增加,S 期达到高峰, G_2 、M 期则明显减少,这种周期性变化恰与细胞增殖过程相关。若细胞增殖活跃,细胞分裂、DNA 复制加速,PCNA 表达就明显增强,故可作为一项评估细胞增殖状态的指标^[3]。我们应用免疫组化技术测定各组胃黏膜 PCNA 染色带,发现用云母预防后大鼠胃窦黏膜细胞增殖带较模型组显著增宽($P < 0.01$),这说明云母有促进胃黏膜细胞增殖的作用,从而有利于黏膜细胞的更新及损伤后的修复。③促进内源性 EGF 的分泌。EGF 是从唾液腺、十二指肠黏膜的腺、胰腺等组织分泌的多肽,它对多种组织有促进增殖和刺激合成的生物活性,也有抑制胃酸分泌和保护胃肠黏膜及促进损伤的黏膜修复的功能^[4,5]。现代药理学研究也证明一些有效的抗溃疡药物的作用与其促进内源性 EGF 释放或 EGF 表达有关,如胶体次枸橼酸铋、硫糖铝等^[6]。杨春敏等^[7]曾临床应用 EGF 口服液治疗慢性萎缩性胃炎。我们也曾应用 EGF 皮下注射治疗按同样方法建立的大鼠萎缩性胃炎的模型,12 周后发现 EGF 可以促进实验性萎缩性胃炎的减轻^[8]。说明 EGF 对已经形成的萎缩性胃炎有一定程度的防治作用。本研究结果显示模型组的血清 EGF 浓度高于正常组($P < 0.05$),而云母高低剂量组及硫糖铝组的血清 EGF 浓度高于模型组($P < 0.05$),说明云母同硫糖铝一样有促进内源性 EGF 的

分泌作用,因此内源性 EGF 分泌的增加可能是云母对胃黏膜保护作用的重要机制之一。

生长激素(GH)是一种单肽链的蛋白质激素,它能促进上皮细胞的 DNA、RNA 和蛋白质合成,对胃黏膜上皮细胞的代谢、生长和分化有调节作用。有研究发现外源性 GH 可增加胃肠黏膜的厚度,使腺体肥大,增殖加快,胃酸及胃蛋白酶分泌增加。本实验结果显示各组之间的血清 GH 的浓度无明显差别,说明云母对胃黏膜保护作用中没有 GH 的参与。

我们认为云母同胃黏膜保护剂硫糖铝相比,云母具有同样确切的胃黏膜保护作用。而且云母价格低廉、资源丰富、加工方便,因此云母可望有良好的临床应用前景,在防治慢性萎缩性胃炎中有应用价值,而且也可能是一种全消化道黏膜保护剂。

[参 考 文 献]

[1] 姒健敏,吴加国,曹 倩,等. 鼠慢性萎缩性胃炎模型的建立及致萎缩因素探讨[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(2): 75-78.

[2] 李经纬,余瀛鳌,蔡景峰,等. 中医大辞典[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2005. 207-208.

[3] Nardone G, Staibano S, Rocco A, et al. Effect of Helicobacter pylori infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis[J]. Gut, 1999, 44(6): 789-799.

[4] Milani S, Calabro A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing[J]. Microse Res Tech, 2001, 53(5): 360-371.

[5] Wong BC, Wong WP, So WH, et al. Epidermal growth factor and its receptor in chronic active gastritis and gastroduodenal ulcer before and after Helicobacter pylori eradication[J]. Alimnt Pharmacol Ther, 2001, 15(9): 1459-1465.

[6] Tarnawski A, Tanoue K, Santos AM, et al. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? [J]. Scand J Gastroenterol Suppl, 1995, 210(3): 9-14.

[7] 杨春敏,陈寿坡. 表皮生长因子对大鼠胃黏膜的保护作用及机制探讨[J]. 中华消化杂志, 1996, 16(4): 200-203.

[8] 吴加国,姒健敏,曹 倩,等. 表皮生长因子对 SD 大鼠萎缩性胃炎的作用[J]. 中华内科杂志, 2001, 40(3): 169-171.