

· 论著 ·

慢性浅表性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡与中医证型的相关性

王丽 王垂杰 孙晓婷

【摘要】 目的 探讨慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)大鼠不同证型胃黏膜细胞凋亡及其调控基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lym-phoma/Leukemia-2, Bcl-2)mRNA 表达水平的变化,从细胞凋亡的角度揭示 CSG 各证候的实质。**方法** 复制大鼠单纯 CSG 模型、脾虚 CSG 和湿热 CSG 模型,检测胃黏膜上皮细胞凋亡指数及其调控基因 Bcl-2 mRNA 表达水平。**结果** 三个模型组大鼠胃黏膜细胞凋亡指数均显著高于正常对照组,以脾虚 CSG 组最高。三个模型组较正常组 Bcl-2 mRNA 表达均降低,以脾虚 CSG 组最低。**结论** CSG 大鼠胃黏膜细胞凋亡指数、Bcl-2 mRNA 表达水平与 CSG 证候有一定的相关性,以脾虚 CSG 组大鼠胃黏膜细胞凋亡指数最高和 Bcl-2 mRNA 表达水平最低。

【关键词】 脾虚证; 湿热证; 细胞凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因

【中图分类号】 R573.3+1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.06.001

Correlation between apoptosis of gastric mucosa with Chinese medical pattern in rats with chronic superficial gastritis WANG Li, WANG Chui-jie, SUN Xiao-ting. Nursing College of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Corresponding author: WANG Li, E-mail: wltcm@126.com

【Abstract】 Objective To explore pattern essence from the aspect of apoptosis by observing apoptosis of gastric mucosa and expression of regulatory gene Bcl-2 mRNA in chronic superficial gastritis rats with different Chinese medical patterns. **Methods** CSG rat models, CSG rat models with spleen-deficiency pattern and damp-heat pattern were copied respectively. Apoptosis of gastric mucosa and expression of Bcl-2 mRNA were detected. **Results** Apoptosis indexes of gastric mucosa in model groups, especially in CSG with spleen-deficiency group, were higher than those in normal control group, While the expression of Bcl-2 mRNA were lower than those in normal control group. **Conclusion** There is correlation between apoptosis index of gastric mucosa and expression of Bcl-2 mRNA with Chinese medical patterns in CSG rats. Apoptosis index of gastric mucosa in CSG with spleen-deficiency group is the highest, and the expression of Bcl-2 mRNA is the lowest.

【Key words】 Spleen-deficiency pattern; Damp-heat pattern; Apoptosis; Bcl-2 mRNA

慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)是由多种原因引起的慢性胃粘膜浅表性炎症,此病是目前发病率较高的消化系统疾病之一。相关研究调查^[1]得出结论,脾虚证和湿热证是其中较

多见的证型。细胞凋亡是机体重要生理功能之一,在各组织器官、系统中都存在,而在胃粘膜的炎症病理变化中凋亡细胞明显增多^[2]。本研究复制慢性浅表性胃炎大鼠脾虚证和湿热证病证结合模型,采用原位末端标记(TUNEL)法检测大鼠胃上皮细胞凋亡水平,采用 RT-PCR 法检测凋亡调控基因 Bcl-2 mRNA 表达,以期从细胞凋亡的角度揭示 CSG 不同证候的实质,为建立“证”的微观辨证体系标准提供依据。

作者单位:110847 沈阳,辽宁中医药大学护理学院(王丽、孙晓婷);辽宁省中医院消化科(王垂杰)

作者简介:王丽(1978-),女,博士,讲师。研究方向:中医消化病基础及临床研究。E-mail:wltcm@126.com

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 40 只[合格证号:SCXK(京)2007-0001],体重(170 ± 20)g,雌雄各半。

1.2 分组与造模

按参考文献^[3-5]方法进行模型复制。用随机数字表法选取 10 只作为正常对照组,每天灌胃 2 ml 生理盐水直至造模结束,其它 30 只按体重每天灌 5% 水杨酸钠溶液 10 ml/(kg·d),第一阶段造模时间为 3 周。3 周后,将这 30 只大鼠按随机数字表法分为 3 组,分别为单纯 CSG 组、脾虚 CSG 组、湿热 CSG 组。每组大鼠在每天灌胃 5% 水杨酸钠溶液 10 ml/(kg·d)的同时,单纯 CSG 组不给其它处理因素,脾虚组用破气苦降与饥饱失常法造脾虚模型,用小承气汤(大黄 12 g、厚朴 15 g、枳实 9 g)换算成动物剂量浓缩后 10 ml/(kg·d)每天 1 次灌胃,隔天半量饮食,自由饮水;湿热组予 200 g/L 的蜂蜜水自由饮用,隔日灌服 10 ml/(kg·d)白酒,与白酒隔日灌服 10 ml/(kg·d)油脂。第二阶段造模时间为 2 周。由于灌胃不慎及其它原因所致,湿热 CSG 组大鼠死亡两只,脾虚 CSG 组大鼠死亡 1 只。

1.3 主要试剂

凯基一步法 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒,购自凯基生物公司。Trizol 试剂盒、RT-PCR 试剂盒、引物(2 对)、琼脂糖均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.4 指标检测

大鼠禁食 24 小时,处死,剖开腹腔,迅速剪取胃组织 100 mg,生理盐水冲洗后,放入 -80°C 冰箱保存备用。

1.4.1 TUNEL 法检测细胞凋亡水平 将胃组织制作石蜡切片→脱蜡、水合→细胞通透→加 TUNEL 反应液→加 converter-POD→与底物 DAB 反应显色→光学显微镜计数并拍照。每组按随机数字表法取 5 只大鼠,每只取 1 张切片,每个切片随机观察 5 个视野(视野放大 200 倍),用 BP70 图像分析软件(Olympus 公司)分析细胞凋亡结果,分别计数每个视野阳性细胞和阴性细胞数,取平均值作为切片阳性细胞数和阴性细胞数,以凋亡阳性细胞数和细胞总数(阳性细胞数与阴性细胞数之和)的比率作为该切片的细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。AI = (凋亡细胞数/总细胞数) × 100%。

1.4.2 RT-PCR 法检测凋亡调控基因 Bcl-2 mRNA 表达水平 经过总 RNA 提取→测总 RNA 纯度→逆转录合成 cDNA→PCR 扩增→琼脂糖凝胶电泳后,使用 Gelpro32 凝胶成像分析软件分析各条带光密度值,用目的基因(Bcl-2 mRNA)/内参基因(β -actin mRNA)光密度值计算 RNA 指数(RI)表示 RNA 含量。RI = 目的基因光密度值/ β -actin mRNA 光密度值。每组随机取 5 只大鼠。

1.5 统计学分析

实验数据均采用统计软件 SPSS 17.0 处理,实验数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胃粘膜上皮细胞凋亡指数比较

各组大鼠胃粘膜上皮细胞凋亡指数排列顺序为脾虚 CSG 组 > 湿热 CSG 组 > 单纯 CSG 组 > 正常组。各组数值结果经 Levene 检验方差齐,总体有差异,多组间比较采用 LSD 法:正常组与其它 3 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);脾虚 CSG 组与湿热 CSG 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),脾虚 CSG 组与单纯 CSG 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。病理见图 1。

表 1 各组大鼠胃粘膜上皮细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	视野	细胞凋亡指数(%)
正常组	25	0.07 ± 0.03
单纯 CSG 组	25	$0.35 \pm 0.07^{\text{ac}}$
湿热 CSG 组	25	$0.37 \pm 0.07^{\text{ab}}$
脾虚 CSG 组	25	$0.43 \pm 0.09^{\text{a}}$

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与脾虚 CSG 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

2.2 各组大鼠胃粘膜凋亡调控基因 Bcl-2 mRNA 表达比较

RT-PCR 产物凝胶电泳结果显示,各组大鼠胃组织 Bcl-2 mRNA 的 RT-PCR 产物为大小约 367 bp 的条带,内参基因 β -actin mRNA 的 RT-PCR 产物大小约 227 bp 的条带,用目的基因/内参基因光密度值计算 RNA 指数。各组数值结果经 Levene 检验方差齐,总体有差异,多组间比较采用 LSD 法:3 个模型组较正常组 Bcl-2 mRNA 表达均降低,脾虚 CSG 组 Bcl-2 mRNA 表达最低,与单纯 CSG 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与正常组及湿热 CSG

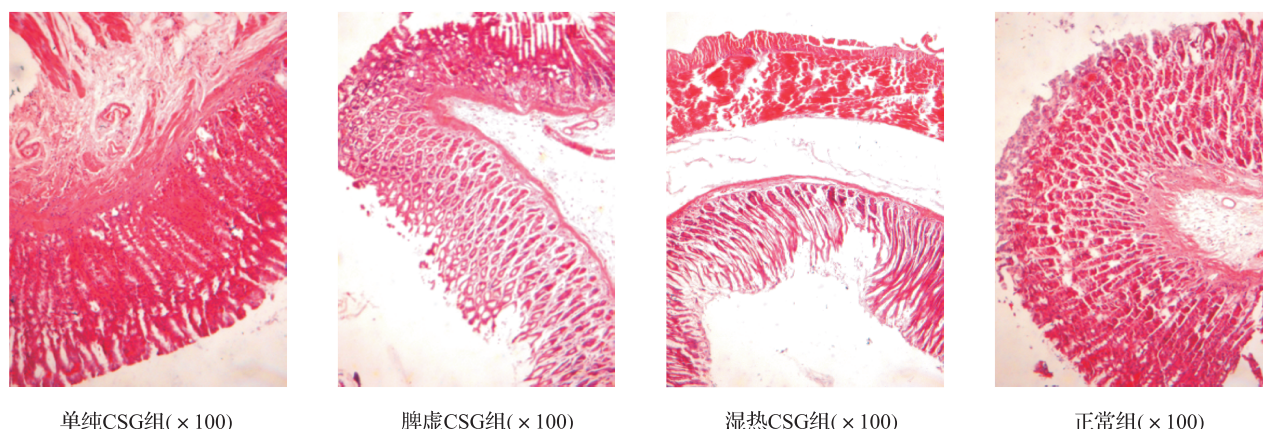


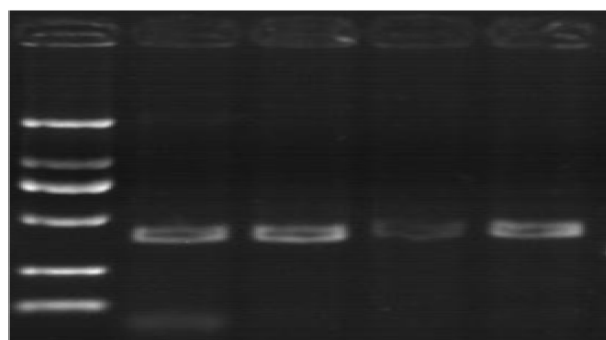
图1 各组大鼠胃粘膜上皮病理图

组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表2,图2。

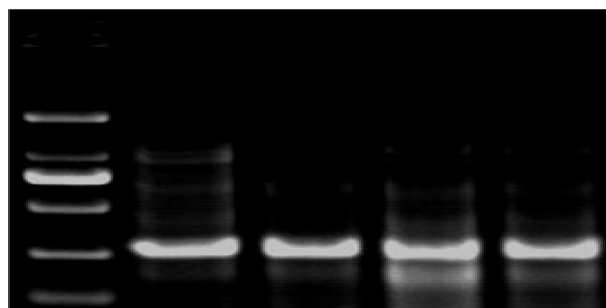
表2 各组大鼠胃粘膜凋亡调控基因 Bcl-2 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2 mRNA 强度	内参强度	Bcl-2 mRNA/内参
正常组	5	76.31 ± 1.54	89.22 ± 1.00	0.86 ± 0.011 ^b
单纯 CSG 组	5	66.43 ± 4.04	86.44 ± 0.83	0.77 ± 0.045 ^a
湿热 CSG 组	5	69.12 ± 1.84	85.63 ± 1.08	0.81 ± 0.040 ^b
脾虚 CSG 组	5	59.34 ± 5.46	87.98 ± 0.80	0.67 ± 0.058

注:与脾虚 CSG 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$



Bcl-2 正常组 单纯 CSG 组 脾虚 CSG 组 湿热 CSG 组



β-actin 正常组 单纯 CSG 组 脾虚 CSG 组 湿热 CSG 组

图2 Bcl-2 mRNA 与 β-actin mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)是细胞在一定的生理病理条件下,遵循自身的程序,自己结束其生命的过程,在各组织器官、系统中都存在。正常胃粘膜的结构和功能依赖于粘膜上皮细胞增殖和凋亡之间的动态平衡,而二者的失衡就可能引起病变。

Bcl-2 家族蛋白是在细胞凋亡过程中起重要作用的一类蛋白质。目前已经在哺乳动物、线虫和细菌中发现并鉴定出了 Bcl-2 家族的 20 余种蛋白质,根据它们在细胞凋亡中的作用可分为两类,一类是抗凋亡蛋白,包括 Bcl-2 等十余个成员;另一类是促凋亡蛋白。Bcl-2 可抑制多种组织的细胞凋亡,而且很可能是阻止凋亡最后的共同的途径^[6]。

本实验通过观察慢性浅表性胃炎不同证型胃粘膜上皮细胞凋亡及凋亡调控基因 Bcl-2 表达情况,探讨同一病理病变不同证型在细胞凋亡方面的差异所在。正常胃粘膜凋亡细胞较少,而在胃粘膜的炎症病理变化中凋亡细胞明显增多。本实验发现各组大鼠胃粘膜上皮细胞凋亡指数排列顺序为脾虚 CSG 组 > 湿热 CSG 组 > 单纯 CSG 组 > 正常组。湿热 CSG 组其胃粘膜炎症反应明显,细胞凋亡增多,而脾虚 CSG 组为虚证,胃粘膜功能减退,细胞凋亡增加。

本实验发现三个模型组较正常组 Bcl-2 mRNA 表达均降低,脾虚 CSG 组 Bcl-2 mRNA 表达最低,与其它三组比较有统计学意义,与单纯 CSG 组比较, $P < 0.05$,与正常组及湿热 CSG 组比较, $P < 0.01$ 。可以得出结论,各组大鼠 Bcl-2 mRNA 表达情况与各组凋亡情况呈负相关,这与以往的部分报道相一致,认为不同胃粘膜病理 Bcl-2 蛋白表达与细胞凋

亡指数呈负相关。

本实验表明,慢性浅表性胃炎不同证型大鼠根据其证的不同凋亡指数亦不同,其中脾虚 CSG 组凋亡指数高于湿热 CSG 组。另凋亡过程的发生与 Bcl-2 的表达有密切的关系。

参 考 文 献

- [1] 谢淑颖,周晓虹. 慢性胃炎的中医常见证型研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(4):53-54.
- [2] 高碧珍,兰启防,李灿东,等. 慢性胃炎证候与幽门螺杆菌及 Bcl-2 蛋白的相关性研究. 福建中医学院学报. 2003, 12, 13 (6):1-3.

- [3] 翁一洁,郑学宝. 大鼠内因湿热造模方法研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):479-480.
- [4] 王利芳,乔樵,朱曙东. 云香复合胃痛胶囊对慢性浅表性胃炎大鼠胃分泌功能的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008,16(6):372-374.
- [5] 宋雅芳,王汝俊,刘友章,等. 健脾益气中药对脾虚大鼠肝组织线粒体功能的影响[J]. 中药新药与临床药理,2009,20 (5):423-426.
- [6] 彭黎明,王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:412-414.

(收稿日期:2013-04-08)

(本文编辑:黄凡)

青蒿酯对房颤大鼠心肌核转录因子- κ B 表达的干预作用

焦华琛 张蕴慧 李运伦

【摘要】 目的 通过建立房颤大鼠模型,观察核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B) mRNA 的表达水平以及青蒿提取物对其表达的影响。**方法** 40 只大鼠按随机数字表法分为空白对照组、模型组、青蒿组、卡托普利组,每组 10 只。利用舌下静脉注射乙酯胆碱和氯化钙的方法建立房颤大鼠模型,使用青蒿提取物进行干预,以卡托普利作为对照药。实验前 2 周青蒿组以 1.25 g 生药·kg⁻¹灌胃,卡托普利组以 3.25 mg·kg⁻¹灌胃,对照组及模型组均以等体积生理盐水灌胃。通过 PCR 以及 Western-blot 技术观察 NF- κ B mRNA 表达以及 NF- κ B 蛋白表达。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠心肌 NF- κ B mRNA 的表达显著增加($P < 0.05$)。青蒿组能明显减少房颤大鼠心肌 NF- κ B mRNA 的表达($P < 0.05$),卡托普利对 NF- κ B mRNA 的表达无影响。NF- κ B 蛋白的表达与 mRNA 的表达呈一致规律。**结论** NF- κ B 与房颤的发生关系密切。房颤大鼠 NF- κ B 的表达明显增加。青蒿提取物能够有效地减少房颤大鼠心肌 NF- κ B 的表达,这可能是青蒿抗心律失常的机制之一。

【关键词】 房颤; 核转录因子- κ B; 青蒿

【中图分类号】 R256.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.06.002

The atrial fibrillation rat myocardial expression of NF- κ B and Artemisia annua extracts intervention role JIAO Hua-chen, ZHANG Yun-hui, LI Yun-lun. Heart disease department, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji Nan 250011, China

Corresponding author: JIAO Hua-chen, E-mail: liyixuan0531@163.com

【Abstract】 Objective Through the establishment of a rat model of atrial fibrillation, observed the expression of NF- κ B mRNA expression levels, and affect Artemisia annua extract has on it. **Methods** Establish a rat model of atrial fibrillation, the use of Artemisia annua extract intervention to captopril as controls. NF- κ B mRNA expression and protein expression were observed by PCR and Western-blot. **Results** Compared with the control group, model group rat cardiac NF- κ B mRNA expression was significant-

基金项目:山东省中青年科学家奖励基金(2010BSA01005)

作者单位:250011 济南,山东中医药大学附属医院心病科(焦华琛、张蕴慧、李运伦)

作者简介:焦华琛(1977-),女,博士,主治医师。研究方向:中医药治疗心律失常的基础和临床研究。E-mail: liyixuan0531@163.com