

清热化湿方对幽门螺杆菌感染小鼠的抗菌和抗炎作用

于 靖¹, 叶 晖¹, 李 宁¹, 李 江², 陈 瑶¹, 张学智^{1*}
(1. 北京大学第一医院中医、中西医结合科, 北京 100034; 2. 北京大学第一医院消化科, 北京 100034)

摘要: **目的** 评价清热化湿方(黄连、栀子、蒲公英等)对幽门螺杆菌感染小鼠的杀菌作用及对核因子 κ B (NF- κ B) p65、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 8 (IL-8)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达水平的影响。**方法** 44 只 SPF 级 KM 小鼠随机分为 4 组, 即空白对照组、模型对照组、清热化湿方组、西药三联组(甲硝唑、克拉霉素、兰索拉唑)。除空白对照组外, 其余 3 组小鼠均采用短期免疫抑制联合经口感染建立幽门螺杆菌感染模型。小鼠均于给药 4 周后处死, 通过快速尿素酶(RUT)及组织学染色判断幽门螺杆菌的根除情况; 苏木素-伊红(HE)染色观察幽门螺杆菌的定植程度和胃黏膜炎症情况; 荧光定量 PCR、免疫组化法测定胃黏膜 NF- κ B p65、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的表达水平。**结果** 幽门螺杆菌根除率为模型对照组 0/10、清热化湿方组 3/10、西药三联组 7/10。光镜下观察发现, 模型对照组幽门螺杆菌定植量显著增加, 存在局部炎症细胞聚集; 西药三联组幽门螺杆菌呈局部少量聚集, 多数无炎症细胞浸润; 清热化湿方组幽门螺杆菌在局部聚集相对较多, 无明显炎症细胞浸润。西药三联组和清热化湿方组 *Il1b*、*Il8*、*Tnfa*、*Nfkb* p65 mRNA 表达水平均显著高于模型对照组; 免疫组化结果显示西药三联、模型对照、清热化湿方 3 组间 NF- κ B p65 核/浆光密度比值差异不显著。**结论** 清热化湿方对感染小鼠幽门螺杆菌的根除作用有限, 但可明显改善胃黏膜炎症。清热化湿方组与西药三联组 *Il1b*、*Il8*、*Tnfa* 和 *Nfkb* p65mRNA 表达水平均显著升高, 且表达趋势较为相似, 可能与蛋白水平抑制所致的负反馈作用相关, 从而影响炎症的发生。

关键词: 幽门螺杆菌; 清热化湿方; 根除率; 炎症; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)01-0007-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.002

Anti-bacterial and anti-inflammatory effects of Qingre Huashi Formula on *Helicobacter pylori*-infected mice

YU Jing¹, YE Hui¹, LI Ning¹, LI Jiang², CHEN Yao¹, ZHANG Xue-zhi^{1*}

(1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2. Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

ABSTRACT: **AIM** To evaluate the bactericidal activity of Qingre Huashi Formula (*Coptidis Rhizoma*, *Gardeniae Fructus*, *Taraxaci Herba*, etc.) against *Helicobacter pylori* in infected mice and the effects on NF- κ B p65, IL-1 β , IL-8 and TNF- α expression levels. **METHODS** Forty-four SPF KM mice were randomly divided into four groups, blank control, model control, Qingre Huashi Formula and triple therapy (metronidazole, clarithromycin and lansoprazole) groups. Except the blank control group, mice in another three groups were infected with *H. pylori* through short-term immunosuppression combined with oral infection. Administration lasted for four weeks. All mice were sacrificed. Rapid urease test (RUT) and histological staining were performed to identify the eradication of *H. pylori*. HE staining was applied to observing the *H. pylori* colonization degree and gastric mucosal inflammation. NF- κ B p65, IL-1 β , IL-8 and TNF- α expression levels in gastric mucosa were measured through fluorescent-quantitative PCR and immunohistochemistry. **RESULTS** *H. pylori* eradication rates were model control 0/10,

收稿日期: 2016-09-07
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473474)
作者简介: 于 靖(1989—), 女, 博士生, 从事损伤性胃黏膜病的中西医结合诊疗。E-mail: jing50529@163.com
* 通信作者: 张学智(1965—), 男, 教授, 从事消化系统疾病的中西医结合诊疗。Tel: (010) 83572634, E-mail: zhang.xuezhi@263.net

Qingre Huashi Formula 3/10, triple therapy 7/10. Under the light microscope observation, model control group possessed massive *H. pylori* colonization and partial inflammatory cell infiltration. In triple therapy group, *H. pylori* colonization and inflammation was slight. Qingre Huashi Formula group had much local accumulation of *H. pylori* with no obvious inflammatory cell infiltration. The *Il1b*, *Il8*, *Tnfa* and *Nfkb p65* mRNA expression levels of triple therapy and Qingre Huashi Formula groups were significantly higher than those of model control group. Immunohistochemistry results displayed no statistical significance among triple therapy, model control and Qingre Huashi Formula groups in the ratio of nucleus/cytoplasm optical density. **CONCLUSION** Qingre Huashi Formula has a limited eradication activity against *H. pylori* in infected mice with an obvious improvement of gastric mucosa inflammation. The *Il1b*, *Il8*, *Tnfa* and *Nfkb p65* mRNA expression levels of Qingre Huashi Formula and triple therapy groups' markedly increasing with similar expression tendency is possibly related to the negative feedback effect induced by inhibition of protein levels, thus affects the occurrence of inflammatory.

KEY WORDS: *Helicobacter pylori* Formula; Qingre Huashi Formula; eradication rate; inflammation; inflammatory factors

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是慢性胃炎、胃溃疡等多种上消化道疾病的主要致病因子, 并通过诱导炎症的发生从而对胃黏膜造成损伤。近年来, 多项研究发现 *H. pylori* 感染与脾胃湿热证、脾胃湿热证与炎症因子之间关系密切^[1-3]。因此, 清热化湿法在充当脾胃湿热证治疗法则的同时, 对 *H. pylori* 及胃黏膜炎症可能具有治疗及改善作用。清热化湿方是我院院内自制剂, 具有自主知识产权, 在临床实际应用中发现其对 *H. pylori* 相关性胃病具有一定的改善症状作用。同时, 既往研究结果^[4]已表明该药对 *H. pylori* 具有良好的体外抑制效果。本研究通过建立 *H. pylori* 感染小鼠动物模型, 评价清热化湿方对 *H. pylori* 的体内根除效果, 并观察该药物对胃黏膜炎症情况及相关因子表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 *H. pylori* SS1 由北京大学第一医院消化内科提供, -80 ℃ 冰箱保存。

1.1.2 实验动物 44 只 SPF 级雄性 KM 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

1.1.3 药品 清热化湿颗粒冲剂 (组成为黄连、栀子、蒲公英、苦杏仁、豆蔻仁、苍术、薏苡仁、茯苓、车前草、法半夏、厚朴; 制备方法: 取厚朴、豆蔻仁、苍术挥发油置于容器中, 蒸馏后的水溶液另外收集, 将上述水溶液药渣与其余 8 味药材加水煎煮 2 次, 第 1 次 1.5 h, 第 2 次 1 h, 合并 2 次煎液, 滤过, 滤液与上述水溶液合并, 合并液浓

缩成 60 ℃ 热测相对密度为 1.30~1.35 的清膏, 置于容器中, 整粒, 干燥; 北京大学第一医院, 批号 20120412); 甲硝唑 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 20120228); 克拉霉素 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 20120704); 兰索拉唑 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 20130205); 注射用环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 13071225)。

1.1.4 试剂及仪器 哥伦比亚琼脂 (英国 OXOID 公司, 批号 No. 1365394); 脑心脊液 (英国 OXOID 公司, 批号 No. 715930); 脱纤维羊血 (北京宝特医疗器械有限公司, 批号 No. 2015/060901); 10% 福尔马林 (北京大学第一医院中心实验室); RUT 试剂 (北京大学第一医院消化内科提供); 苏木素-伊红染色液 (上海沪峰生物科技有限公司, XW-RS-001); DEPC 处理水 (Solarbio, 批号 No. 20120605); RNAlater Solution (Invitrogen, 批号 No. 1210008); Trizol Reagent (Invitrogen, 批号 No. 1382739); 反转录试剂盒 (Thermo scientific, K1631); SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒 (TOYOBO, QPK-201); UltraSensitive[™] S-P 免疫组化试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司, 羊抗鼠/兔, kit-0305); 一抗为 NF-κB 兔抗鼠抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, BA0610, 1:100); PBS (Gibco, 10010-023); DAB 显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司, Cat. No.: DAB-0031/1031); 组织包埋仪 (亚光, YB-7B 型); 组织摊片烤片机 (湖北博大电子科技有限公司, BT-330 型); 石蜡切片机 (Taiva, R135); 光学显微镜 (OLYMPUS-BX51); 实时荧

光定量 PCR 检测系统（Bio-Rad IQ5）。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 培养及菌液制备 将 *H. pylori* SS1 均匀接种于含有 8% 脱纤维羊血的哥伦比亚血琼脂培养基中，采用抽气换气法，于 37 ℃ 微需氧环境下（15% CO₂、5% O₂、80% NO₂）培养48 ~ 72 h，阳性者进行传代培养；通过观察菌落形态，革兰染色，以及快速尿素酶、过氧化氢、氧化酶试验对菌株进行鉴定。用无菌接种环收集 *H. pylori* 菌落于脑心脊液中，菌悬液稀释至 4 麦氏浊度，即 1.2 × 10⁹ CFU/mL。

1.2.2 动物分组及模型制备^[5] 将 44 只 SPF 级 KM 小鼠随机分为空白对照组、模型对照组、清热化湿方组、西药三联组，每组 11 只。适应性饲养 3 d 后，除空白对照组外，其余各组小鼠均给予环磷酸胺 200 mg/kg 腹腔注射，注射次日起给予 *H. pylori* 菌悬液 0.4 mL/只灌胃，隔日 1 次，共 5 次。各组小鼠灌胃前均禁食 24 h，灌胃后禁食禁水 2 h，末次灌胃 2 周后，随机检杀 1 只小鼠，通过快速尿素酶（RUT）、Warthin-Starry（W-S）银盐染色判断 *H. pylori* 在小鼠胃黏膜的定植情况，RUT 及 W-S 染色均为阳性者可判断为定植成功。

1.2.3 药物干预 空白对照组不予干预，其余各组小鼠均于模型建立成功后第 2 天开始灌胃给药。西药三联药物临床剂量参照《第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》^[6]，即甲硝唑 400 mg bid，克拉霉素 500 mg bid，兰索拉唑 30 mg bid；清热化湿颗粒冲剂临床剂量为 600 mg/kg。实验药物剂量参照动物剂量换算表，以标准体质量进行换算，换算公式为 $D_b = D_a \times R_{ab}$ ，其中由成人 a 到小鼠 b 的 mg/kg 剂量换算系数 R_{ab} 为 12.33，经换算后，动物给药剂量如下^[7]：模型对照组给予灭菌注射用水 4 周；清热化湿方组给予清热化湿颗粒7 398 mg/kg，连续给药 4 周；西药三联组给予甲硝唑 164.40 mg/kg、克拉霉素 205.54 mg/kg、兰索拉唑 12.33 mg/kg，第 1 周连续给药，后 3 周给予灭菌注射用水。各组动物均于 4 周后处死。

1.2.4 *H. pylori* 根除率评估 动物处死后，取出胃组织，沿胃大弯剪开，用 4 ℃ 的 DEPC 处理水冲洗胃内容物后，取一半胃组织，其中取部分胃窦组织进行 RUT 试验，剩余组织置于多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋切片后进行 W-S 染色。RUT 及 W-S 染色结果均为阴性者则判定 *H. pylori* 根除成功。

1.2.5 *H. pylori* 定植及胃黏膜炎症程度评估 石

蜡包埋切片后，经 HE 染色观察 *H. pylori* 的定植及小鼠胃黏膜炎症情况。*H. pylori* 定植及黏膜炎症程度判定标准如下^[8]。①*H. pylori* 感染：观察胃黏膜黏液层、表面上皮、小凹上皮和腺管上皮表面的 *H. pylori*。0，特殊染色片上未见 *H. pylori*；+，偶见或小于标本全长 1/3 有少数 *H. pylori*；++，*H. pylori* 分布等于或超过标本全长 1/3 而未达 2/3 或连续性、薄而稀疏地存在于上皮表面；+++，*H. pylori* 成堆存在，基本分布于标本全长。②慢性炎症（单核细胞浸润）：根据黏膜层慢性炎性细胞的密集程度和浸润深度分级，两可时以前者为主。0，单核细胞每高倍视野下不超过 5 个；+，慢性炎性细胞较少并局限于黏膜浅层，不超过黏膜层的 1/3；++，慢性炎性细胞密集，不超过黏膜层的 2/3；+++，慢性炎性细胞密集，占据黏膜全层。

1.2.6 *Nfkb p65*、*Il1b*、*Il8*、*Tnfa* mRNA 表达水平测定 ①总 RNA 的提取及 cDNA 合成：取胃窦组织另一半投入 4 ℃ 的 RNA later，并保存于 -70 ℃ 环境下。将冻存组织用匀浆仪进行匀浆处理，以 Trizol-氯仿法提取总 RNA，并采用 RT-PCR 合成其 cDNA。②引物：引物设计见表 1。③荧光定量 PCR：采用 20 μL 反应体系于 95 ℃ 15 min，95 ℃ 15 s，61 ℃ 60 s 扩增 40 个循环，扩增后对产物作溶解曲线，每个样本重复 3 次。

表 1 引物设计

Tab. 1 Primer design

基因	引物	PCR 条件
<i>Il1b</i>	正向 5'-GAAATGCCACCTTTTGACACTG-3'	退火 60 ℃
	反向 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'	40 个循环
<i>Il8</i>	正向 5'-ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC-3'	退火 61 ℃
	反向 5'-AACCTCTGACCCAGTTTTC-3'	40 个循环
<i>Tnfa</i>	正向 5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'	退火 62 ℃
	反向 5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTAG-3'	40 个循环
<i>Nfkb p65</i>	正向 5'-ACTGCCGGGATGGCTACTAT-3'	退火 61 ℃
	反向 5'-TCTGGATTGCTGGCTAATGG-3'	40 个循环
<i>Gapdh</i>	正向 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'	退火 60 ℃
	反向 5'-GATGCAGGGATGATGTTTC-3'	40 个循环

1.2.7 NF-κB p65 免疫组化测定 石蜡切片脱蜡并水化，经高压抗原修复后滴加过氧化物酶阻断溶液，于室温下孵育 10 min，PBS 冲洗 3 × 3 min，滴加非免疫性动物血清并在室温下孵育 10 min，甩去血清，加一抗，室温下孵育 60 min 或 4 ℃ 过夜，PBS 冲洗 3 × 5 min，滴加生物素标记的二抗，室温下孵育 10 min，PBS 冲洗 3 × 3 min，滴加链霉菌抗生物素-过

氧化物酶溶液,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗 3 × 3 min,甩去 PBS 液,每张切片加 1~2 滴新鲜配制的 DAB,显微镜下观察 3~10 min,阳性显色为棕色或黄色,自来水冲洗,苏木素复染,自来水冲洗 10~15 min,经梯度酒精脱水干燥后,中性树胶封固。根据平均光密度值法分析细胞核浆中 NF-κB p65 表达含量,计算核/浆光密度比值。

1.2.8 统计学方法 统计分析采用 SPSS 20.0 软件,各处理组间根除率比较采用 Fisher 精确检验法,各处理组间炎症因子表达水平采用单因素方差分析进行多重比较。其中,方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Games-Howell 法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 *H. pylori* 根除率 空白对照、模型对照、西药三联、清热化湿方 4 组 RUT 阴性率分别为 100%、0%、70% 和 30%;组织病理阴性率分别为 100%、0%、80% 和 30%。综合两种检测方法,*H. pylori* 根除率结果分别为:模型对照组 0,清热化湿方组 30%,西药三联组 70%。统计结果显示,西药三联组根除率显著高于模型对照组和清热化湿方组($P < 0.05$),清热化湿方组与模型对照组差异不显著($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 *H. pylori* 根除率($n = 10$)

Tab. 2 <i>H. pylori</i> eradication rates($n = 10$)			
组别	RUT 阴性	组织病理阴性	根除率
空白对照组	10/10	10/10	—
模型对照组	0/10	0/10	0/10
西药三联组	7/10	8/10	7/10 [#]
清热化湿方组	3/10	3/10	3/10 [▲]

注:与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$;与西药三联组比较,[▲] $P < 0.05$

2.2 *H. pylori* 定植及胃黏膜炎症程度 *H. pylori* 定植程度评估结果显示,空白对照组无 *H. pylori* 定植;模型对照组 *H. pylori* 定植程度以“+”、“++”级居多,个别呈“+++”级定植;西药三联组多数无 *H. pylori* 定植,少数呈“+”级定植;清热化湿方组多数呈“+”级定植,少数无 *H. pylori* 定植,个别呈“++”级定植。胃黏膜炎症程度评估结果显示,空白对照、西药三联、清热化湿方 3 组无炎症细胞浸润,模型对照组少数呈“+”级浸润。见表 3。

胃黏膜组织光镜观察发现,模型对照组 *H. pylori* 定植量显著增加,存在局部炎症细胞聚集;西药三联组 *H. pylori* 呈局部少量聚集,多数无炎症细胞浸润;清热化湿方组 *H. pylori* 在局部聚集

较多,无明显炎症细胞浸润(如箭头所示,图 1B 中胃黏膜表层可见大量螺旋状 *H. pylori*,图 1D 中局部可见少量 *H. pylori* 浸润,呈短杆状、略弯曲形态粘附于胃黏膜表层;图 1E 中可见局部炎症细胞浸润)。见图 1。

表 3 *H. pylori* 定植与胃黏膜炎症程度($n = 10$)

组别	<i>H. pylori</i> 定植程度				胃黏膜炎症程度			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++
空白对照组	10	0	0	0	10	0	0	0
模型对照组	0	4	5	1	7	3	0	0
西药三联组	7	3	0	0	10	0	0	0
清热化湿方组	3	6	1	0	10	0	0	0

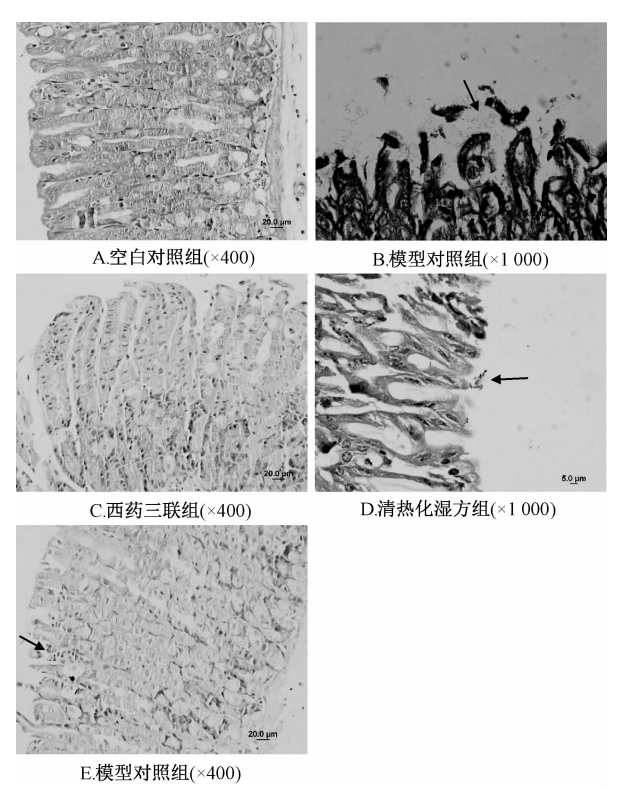


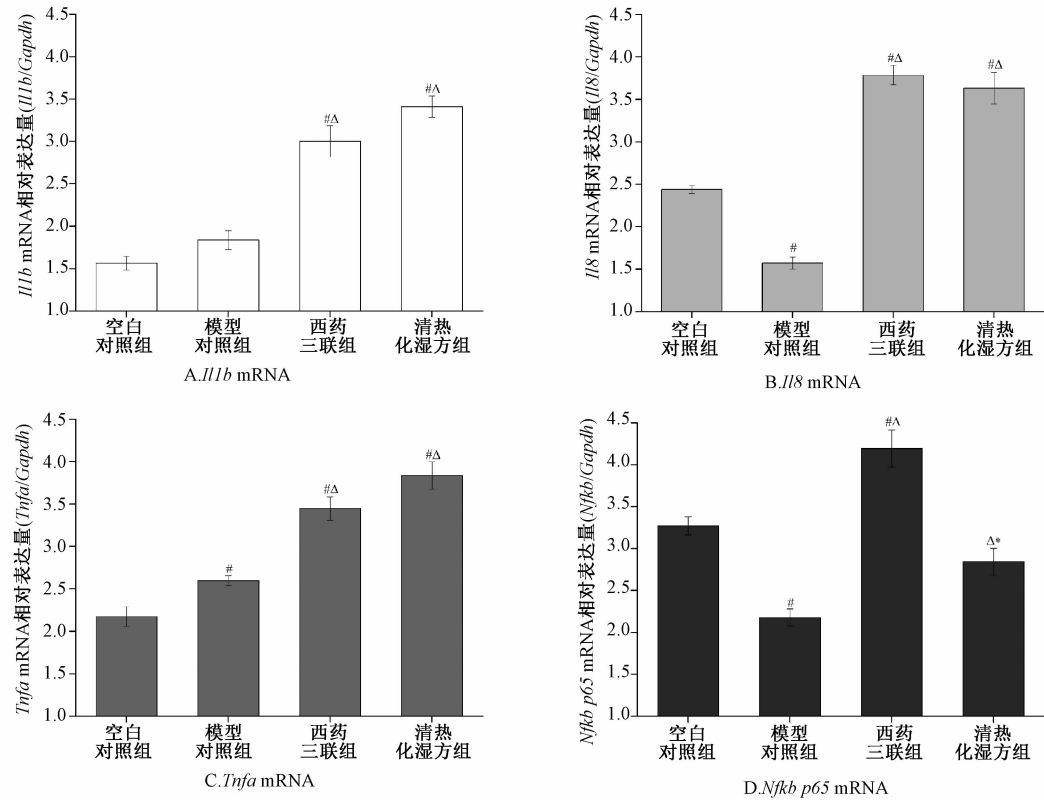
图 1 HE 染色图

Fig. 1 HE staining graphs

2.3 *Il1b*、*Il8*、*Tnfa*、*Nfkb* p65 mRNA 表达水平 图 2A:空白对照组、模型对照组、西药三联组和清热化湿方组的 *Il1b* mRNA 相对表达量分别为 1.56、1.84、3.00 和 3.41,统计结果显示,空白对照组和西药三联、清热化湿方两组之间差异性显著($P < 0.05$),空白对照组与模型对照组之间差异性不显著($P = 0.213 > 0.05$),西药三联组和清热化湿方组 *Il1b* mRNA 相对表达量显著高于空白和模型对照组($P < 0.05$),西药三联和清热化湿方组之间差异不

显著($P=0.269>0.05$)。图 2B:空白对照组、模型对照组、西药三联组和清热化湿方组的 *Il8* mRNA 相对表达量分别为 2.44、1.57、3.78 和 3.63,统计结果显示,模型对照组 *Il8* mRNA 相对表达量显著低于空白对照组($P<0.05$),西药三联和清热化湿方组显著高于空白和模型对照组($P<0.05$),西药三联和清热化湿方组之间差异性不显著($P=0.901>0.05$)。图 2C:空白对照组、模型对照组、西药三联组和清热化湿方组的 *Tnfa* mRNA 相对表达量分别为 2.17、2.60、3.45 和 3.84,统计结果显示,模型对照、西药三联和清热化湿方组 *Tnfa* mRNA 相对表达

量显著高于空白对照组($P<0.05$),西药三联和清热化湿方组显著高于模型对照组($P<0.05$),且该两组间差异性不显著($P=0.266>0.05$)。图 2D:空白对照组、模型对照组、西药三联组和清热化湿方组的 *Nfkb p65* mRNA 相对表达量分别为 3.27、2.18、4.19 和 2.84,统计结果显示,模型对照组相对表达量显著低于空白对照组($P<0.05$),西药三联组显著高于空白对照组、模型对照组和清热化湿方组($P<0.05$),清热化湿方组显著高于模型对照组($P<0.05$),与空白对照组之间差异不显著($P=0.132>0.05$)。



注:与空白对照组比较, # $P<0.05$;与模型对照组比较, Δ $P<0.05$;与西药三联组比较, * $P<0.05$ 。空白对照组 $n=8$,模型对照组 $n=8$,西药三联组 $n=10$,清热化湿组 $n=10$

图 2 *Il1b*、*Il8*、*Tnfa*、*Nfkb p65* mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)
Fig. 2 *Il1b*, *Il8*, *Tnfa* and *Nfkb p65* mRNA relative expression values($\bar{x} \pm s$)

2.4 NF-κB p65 免疫组化 应用 ImagePro-Plus 软件测定细胞核、细胞浆平均光密度,计算核/浆光密度比值,免疫组化染色见图 3。

图 4A:空白对照、模型对照、西药三联和清热化湿方组的细胞浆平均光密度分别为 110.04、110.85、113.67 和 112.81。统计结果显示,西药三联组细胞浆平均光密度显著高于空白对照组($P<0.05$),空白对照组和模型对照、清热化湿方两组间差异不显著($P=0.607, P=0.064$),模型对照和清

热化湿方、西药三联组($P=0.214, P=0.075$)以及清热化湿方和西药三联组($P=0.561$)之间差异不显著。图 4B:空白对照、模型对照、西药三联和清热化湿方组的细胞核平均光密度分别为 25.18、31.17、30.06 和 33.85。统计结果显示,模型对照和清热化湿方组的细胞核平均光密度显著高于空白对照组($P<0.05$),西药三联和空白对照组之间差异不显著($P=0.081$),模型对照和清热化湿方、西药三联组($P=0.825, P=0.061$)以及清热化湿方和西

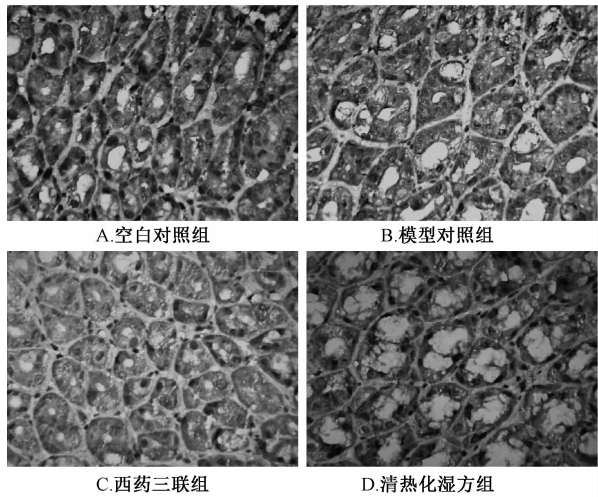


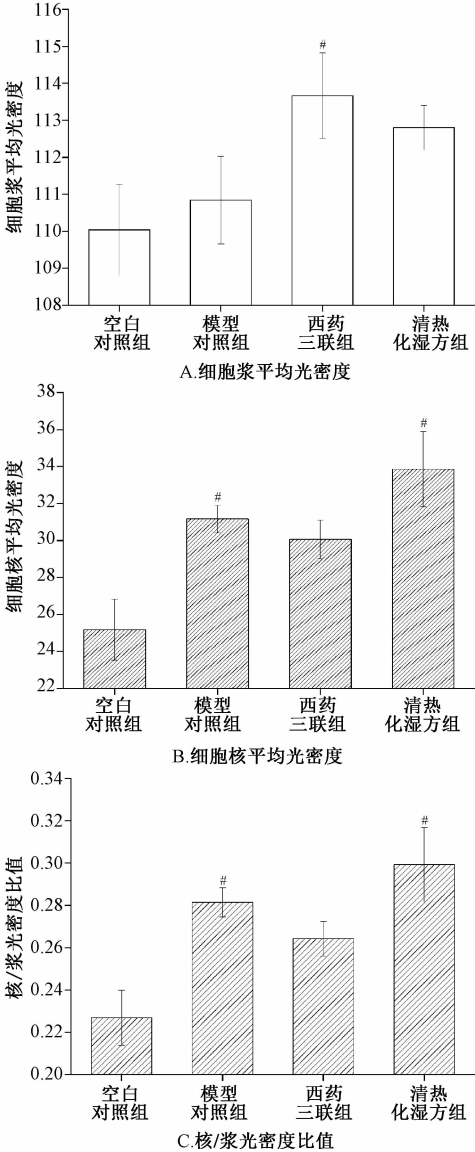
图 3 NF-κB p65 免疫组化染色图(×400)
Fig. 3 NF-κB p65 immunohistochemical staining graphs(×400)

药三联组($P = 0.365$)之间差异性不显著。图 4C: 空白对照、模型对照、西药三联和清热化湿方组的核/浆光密度比值分别为 0.23、0.28、0.26 和 0.30。统计结果显示,模型对照和清热化湿方组的核/浆光密度比值显著高于空白对照组($P < 0.05$),西药三联和空白对照组之间差异不显著($P = 0.094$),模型对照和西药三联、清热化湿方组($P = 0.783, P = 0.386$)以及西药三联和清热化湿方组之间差异均不显著($P = 0.291$)。

3 讨论

炎症是机体质量要的免疫应答反应,TLRs-NF-κB-炎症因子共同构成了 *H. pylori* 所致胃黏膜炎症的重要通路。TLRs 信号通路目前被认为是炎症反应的启动闸门,TLRs 是菌体成分脂多糖(LPS)、热休克蛋白 60(HSP60)的受体,在慢性胃炎、萎缩性胃炎和肠上皮化生患者 *H. pylori* 阳性者胃黏膜内 TLR4 的表达水平显著高于 *H. pylori* 阴性者,表明 *H. pylori* 感染可能通过参与上调 TLR4 的表达诱导炎症的发生^[9]。TLRs 信号通路被激活后,通过髓样分化蛋白 88(MyD88)、IL-1 受体相关激酶(IRAK)、TNF 受体相关因子 6(TRAF6)等一系列物质的活化,激活 NF-κB,从而启动炎症因子的转录,使大量炎症因子释放,其中 IL-1β、IL-8、TNF-α 在炎症反应的发生中起着重要作用^[10]。

近年来,有临床研究结果显示 *H. pylori* 相关性胃病的中医证型出现频率依次为脾胃湿热证 > 肝胃不和证 > 脾胃虚弱证 > 胃络瘀阻证,以脾胃湿热证为主;主要证候要素出现频率依次为热 > 湿 > 气



注:与空白对照组比较, # $P < 0.05$ 。空白对照组 $n = 10$, 模型对照组 $n = 8$, 西药三联组 $n = 10$, 清热化湿组 $n = 10$

图 4 细胞核、细胞浆 NF-κB p65 表达
Fig. 4 NF-κB p65 expressions in nucleus and cytoplasm

滞 > 寒 > 血瘀 > 气虚 > 阴虚,以热、湿频次最高^[1]。此外,既往研究证实,*H. pylori* 相关性胃病与中医寒热证型具有高度相关性,*H. pylori* 感染率和感染密度在热证组检出率最高;急、慢性炎症程度在热证组也较寒证组为重;同时,热证组中胃黏膜 IL-8 及 TNF 的表达水平显著高于其他组别^[2-3]。上述研究表明,*H. pylori* 与中医脾胃湿热证、脾胃湿热证与炎症的发生密切相关。因此,清热化湿法在治疗 *H. pylori* 相关性胃病方面具有一定的理论基础,可能对 *H. pylori* 的根除及胃黏膜炎症的改善具有相关作用。

本研究所涉及药物为清热化湿方,该方为我院

院内自制剂,具有清热化湿、健脾和胃的功效,临床常用于慢性胃炎、胃溃疡及肝病等消化系统疾病的治疗。该方组成成分主要为清热类及祛湿类药物:清热类有黄连、栀子、蒲公英,其中黄连清泻胃火及中焦脾胃湿热,栀子可泻三焦火邪并导热下行,蒲公英可清热利湿、消痈散结;祛湿类有苦杏仁、豆蔻仁、苍术、薏苡仁、茯苓、车前草、法半夏、厚朴 8 味中药,其中苦杏仁宣利上焦肺气(肺气调和、气机舒畅则湿邪亦祛),豆蔻仁芳香化湿、行气调中,苍术清利中焦湿邪,薏苡仁、茯苓、车前草渗利下焦湿热,法半夏、厚朴辛开苦降、化湿行气、散满消痞。该方宣上、畅中、渗下而具清热利湿、宣畅三焦气机之功;方中茯苓、豆蔻仁、薏苡仁、苍术具有健脾和胃的功效。在临床实际应用中,我们发现该方对于 *H. pylori* 相关性胃病患者出现的临床症状具有很好的改善作用。既往研究^[4]已证实清热化湿方对 *H. pylori* 具有良好的体外抑杀作用,然而,其在体内对 *H. pylori* 的根除是否可以取得与体外较为一致的结果,及是否可以对胃黏膜炎症起到一定的治疗及改善作用依然未知。因此,本研究通过建立 *H. pylori* 感染小鼠动物模型,评价该方对 *H. pylori* 的体内根除效果及对胃黏膜炎症情况的影响。

研究显示,清热化湿方在动物体内对 *H. pylori* 根除率较低,与模型对照组差异不显著,但是对于 *H. pylori* 定植情况,清热化湿方组较模型对照组有一定程度的减低。对于胃黏膜炎症程度的观察,光镜下我们发现清热化湿方组可以取得与西药三联组类似的炎症改善效果。而在经典炎症因子方面,清热化湿方组 NF- κ B p65 蛋白细胞核内的表达水平与模型对照组、西药三联组并无显著差异;但 *Il1b*、*Il8*、*Tnfa* mRNA 的表达水平,清热化湿方组与西药三联组均较空白对照与模型对照组显著增高。研究结果表明清热化湿方在动物体内的抗菌作用较弱,其原因可能由于所含药物组分中清热类药物较少,而祛湿类药物居多有关,因目前所发现的中药单药中抗 *H. pylori* 作用较强的多属清热类药物^[11-12]。然而,单味中药的应用往往忽视了对患者整体生命体征的考虑,不符合中医辨证论治的要求,对患者的临床症状缺乏有效的改善作用,应用不当甚至取得适得其反的效果,因而中医临床用药仍以复方为多且更具有临床价值。此外,有结果显示质子泵抑制剂(PPI)和两种抗生素联合应用的三联疗法的效果显著高于单用清热化湿方,究其原因,西医治疗作用靶点明确,具有针对性:PPI 抑制胃酸的分泌,可以有

效提高胃内 pH 值,增强两种抗生素的作用,且 PPI 在胃内酸性环境下活性增强,并可穿透黏液层与黏膜表层的尿素酶结合,从而抑制其活性,达到抑制和根除 *H. pylori* 的效果^[13]。但是,同样由于西药作用的单靶点性,在患者未规范化用药的基础上,致病菌极易出现耐药现象,目前的抗生素耐药问题已经严重干扰了临床西医治疗的有效性。中药作为一种多靶点药,临床少有耐药现象发生,且用药多从整体出发,增强患者对疾病的抵抗力。清热化湿方从 *H. pylori* 相关性胃病患者多为湿热证型入手,改善临床症状,并增强脾胃功能,在此基础上,对 *H. pylori* 有着一定的治疗效果,该方“扶正”为主,“祛邪”为辅,有效提高机体抗病能力,阻止外邪入侵。该方对 *H. pylori* 的直接根除作用虽然不甚理想,但作为西医治疗的辅助治疗及后续治疗,是一个很好的选择,不仅可以提高患者用药依从性,对降低西药耐药的发生也具有一定的作用。在病理组织切片中,我们发现除模型对照组有轻微炎症外,西药三联和清热化湿组炎症均不明显,提示西药三联与清热化湿方对 *H. pylori* 引起胃黏膜炎症均具有一定的改善作用。分析 *Il1b*、*Il8*、*Tnfa* mRNA 相对表达量可知,西药三联组和清热化湿组中这 3 种因子 mRNA 表达趋势较为一致,结合光镜下对胃黏膜炎症情况的观察显示出的此两组同样具有一致性,推测这 3 种因子 mRNA 的高度表达可能与药物对蛋白表达水平上的抑制所产生的基因负反馈相关,但并非通过 NF- κ B 信号通路进行调控,可能与药物对蛋白质翻译水平上的调节以及翻译后的折叠和加工修饰有关^[14]。需要注意的是,本实验造模初期除空白对照组外,各组小鼠均采取免疫抑制预处理,给药后各项指标增高也可能与促进了小鼠免疫系统功能的恢复相关。此外,在炎症反应早期阶段,由于机体处于炎症激活状态,一些炎症因子的表达水平会出现短暂的降低,可能导致了 *Il8* mRNA 在模型对照组的表达水平较空白对照组偏低的情况发生。

综上所述,本研究明确了清热化湿方对 *H. pylori* 及胃黏膜炎症的治疗和改善作用,为该方应用于 *H. pylori* 相关性胃病的治疗提供了实验依据。同时,实验尚有诸多不足:首先,对炎症因子表达水平的测定缺乏蛋白水平的直观数据,今后需进一步完善;其次,本实验建立的 *H. pylori* SS1 感染小鼠动物模型,胃黏膜炎症细胞浸润情况不显著,一定程度上影响了实验结果的可靠性,有国内研究报道^[15]指出 *H. pylori* SS1 经口接种小鼠 8 周可成功在胃内定植

并发展为慢性胃炎,因此,今后需进一步延长 *H. pylori* 的定植时长,建立起稳定的炎症模型。

参考文献:

[1] 陈 瑶,刘庆义,叶 晖,等. 幽门螺杆菌相关性胃病中医证型及证候要素演变规律的多中心研究[J]. 现代中医临床, 2015,22(2):12-16.

[2] 张学智,纪宝安,陈宝雯. 炎症因子与十二指肠溃疡寒热辨证的关系[J]. 中国中西医结合杂志,1999,19(5):267.

[3] 张学智,纪保安,陈宝雯,等. 幽门螺杆菌、炎症、白介素-8 与十二指肠溃疡的寒热辨证[J]. 中医杂志,1998,39(10):616-618.

[4] 于 靖,叶 晖,李 江,等. 复方清热化湿制剂对幽门螺杆菌的体外抗菌作用研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016,24(4):245-248.

[5] 叶 晖,李 宁,于 靖,等. 昆明小鼠感染幽门螺杆菌动物模型的建立[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2015,24(3):284-286.

[6] 刘文忠,谢 勇,成 虹,等. 第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J]. 胃肠病学,2012,17(10):618-625.

[7] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9

(9):1069-1072.

[8] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见[J]. 胃肠病学,2013,18(1):24-36.

[9] 谢 勇,吕农华. 幽门螺杆菌相关性胃炎和胃癌前期病变的发病机制[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2008,17(7):536-539.

[10] Beutler B. Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness-the central role of the Toll-like receptors[J]. Crit Care,2003,7(1):39-46.

[11] 王绪霖,缴稳玲,吕宗舜,等. 抑制幽门螺旋菌中药的初步筛选[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14(9):534-536.

[12] 徐 艺,叶 柏,单兆伟,等. 中草药单味与复方对幽门螺杆菌抑菌作用研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志,2000,8(5):292-293.

[13] 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染诊疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2013.

[14] 叶 晖,李 宁,于 靖,等. 荆花胃康胶丸对幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜核因子 κ B p65 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2015,22(2):60-63.

[15] 田雪飞,范学工,张 艳,等. C57BL/6 小鼠幽门螺杆菌感染动物模型的建立[J]. 世界华人消化杂志,2004,12(6):1313-1316.

欧前胡素和异欧前胡素对小鼠肝 CYP450 的影响

王笃军¹, 王 硕², 严 峰³, 王国斌³, 许海玉⁴, 欧阳 臻^{1,2}, 魏 渊^{2*}
(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 3. 江苏吉贝尔药业股份有限公司, 江苏 镇江 212009; 4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: **目的** 探究欧前胡素和异欧前胡素对小鼠肝细胞色素 P450 表达的影响以及对小鼠肝毒性作用。**方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和给药组, 分别灌胃给予相应药物 2 周。荧光定量 PCR 技术考察药物对 P450 主要亚型 mRNA 表达的影响; 蛋白质印迹法检测 P450 表达。试剂盒检测血清中谷丙转氨酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT) 和总胆红素 (TBIL) 水平, HE 染色法观察肝组织变化。**结果** 与对照组相比, 40 mg/kg 欧前胡素对 P450 亚型 1a2 (*Cyp1a2*) 的 mRNA 表达有显著上调作用, 异欧前胡素对 P450 酶亚型 2c37 (*Cyp2c37*) 的 mRNA 的表达有显著上调作用。蛋白质印迹结果显示, 欧前胡素对 CYP1A2 表达有显著上调作用, 异欧前胡素对 P450 亚型 2C (CYP2C) 和 P450 酶亚型 2E1 (CYP2E1) 表达有显著上调作用。血液生化指标显示, 40 mg/kg 异欧前胡素能够导致 GOT 和 TBIL 水平显著升高。病理分析发现, 两种化合物 20 mg/kg 和 40 mg/kg 下均能导致肝脏出现一定程度水肿。**结论** 欧前胡素是 CYP1A2 的诱导剂, 而异欧前胡素是 CYP2C 和 CYP2E1 的诱导剂。两种化合物在 20 mg/kg 和 40 mg/kg 剂量下对小鼠肝脏有损伤作用, 而且异欧前胡素的毒性比欧前胡素强。

关键词: 欧前胡素; 异欧前胡素; 细胞色素 P450; 表达水平; 毒性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)01-0014-07

收稿日期: 2016-05-20
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102522, 81373480, 81202793); 江苏省自然科学基金项目 (BK2011473); 江苏省博士后科研资助计划 (1201081C)
作者简介: 王笃军 (1988—), 男, 博士生, 从事中药药理和毒理学研究。E-mail: wangdj009@163.com
*** 通信作者:** 魏 渊 (1981—), 男, 副教授, 博士, 从事药物代谢和毒理学研究。Tel: (0511) 88791526, E-mail: ywei@ujs.edu.cn