

五丹胃福颗粒对胃癌前病变大鼠炎症因子影响的实验研究

祁向争¹, 李慧臻¹, 闫志杰², 段鑫鑫², 马志豪²

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津, 300150;

2. 天津中医药大学, 天津, 300193)

[摘要] 目的:通过对胃癌前病变(PLGC)大鼠炎症因子等相关指标的检测,阐释五丹胃福颗粒对胃癌前病变大鼠的防治作用。方法:SD大鼠40只,采用改良MNNG+复合法制备PLGC模型,随机分为五丹胃福颗粒高、低剂量组,西药(叶酸)组及模型组,每组10只,连续灌胃给药12周,另取10只正常大鼠设为空白组,灌胃0.9%氯化钠注射液。采用ELISA法检测各组大鼠血清COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B水平。结果:与空白组比较,模型组各指标水平均升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组指标水平均降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);五丹胃福颗粒高、低剂量组与西药组COX-2、NF- κ B水平差异有统计学意义($P < 0.05$);五丹胃福颗粒低剂量组与西药组TNF- α 、IL-1 β 水平差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:五丹胃福颗粒通过抑制PLGC大鼠炎症因子表达,从而影响PLGC的发生发展,并且与叶酸的治疗作用相当。

[关键词] 胃癌前病变;SD大鼠;五丹胃福颗粒;炎症因子;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.08.082

Effect of Wudan Weifu granules on inflammatory factors in rats with precancerous lesion of gastric cancer: An experimental study

QI Xiang-zheng¹, LI Hui-zhen¹, YAN Zhi-jie², DUAN Xin-xin², MA Zhi-hao²

(1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective: To investigate the preventive and therapeutic effects of Wudan Weifu granules in rats with precancerous lesion of gastric cancer (PLGC) by measuring related indices including inflammatory factors. Methods: A total of 40 Sprague-Dawley rats were treated with the modified MNNG + compound method to establish a model of PLGC, and then they were randomly divided into high- and low-dose Wudan Weifu granule groups, Western medicine (folic acid) group, and model group, with 10 rats in each group. The drugs were given by gavage for 12 consecutive weeks. Another 10 normal rats were selected as blank group and were given 0.9% sodium chloride injection by gavage. ELISA was used to measure the serum levels of cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and nuclear factor- κ B (NF- κ B). Results: Compared with the blank group, the model group had significant increases in the levels of the above indices ($P < 0.01$); compared with the model group, each treatment group had significant reductions in the levels of these indices ($P < 0.01$). There were significant differences in the levels of COX-2 and NF- κ B between the high- and low-dose Wudan Weifu granule groups and the Western medicine group ($P < 0.05$), and there were significant differences in the levels of TNF- α and IL-1 β between the low-dose Wudan Weifu granule group and the Western medicine group ($P < 0.01$). Conclusion: Wudan Weifu granules can influence the development and progression of PLGC by inhibiting the expression of inflammatory factors in rats with PLGC and has a similar therapeutic effect as folic acid.

Key words: precancerous lesion of gastric cancer; Sprague-Dawley rat; Wudan Weifu granule; inflammatory factor; experimental study

胃癌是消化系统疾病中发病率最高的肿瘤之一,目前发病机制尚不明确。1988年Correa等^[1]提出胃癌的发生模式为:正常胃黏膜-慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-小肠型肠上皮化生-大肠型肠上皮化生-异型增生(中重度)-胃癌(肠型),这是目前较为认可的胃癌进展模式。

胃癌前病变(PLGC)包括慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生、异型增生,目前用低级别上皮内瘤变和高级别上皮内瘤变表示,这个阶段具有双向转化的特点,是防治的重要时期。五丹胃福颗粒是天津中医药大学第二附属医院院内制剂,临床应用二十余年,对PLGC患者有良好的改善症状、保护

胃黏膜、逆转病理、抗 HP 感染的作用^[2-5]。本研究通过研究五丹胃福颗粒对 PLGC 大鼠 COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 的影响,阐释五丹胃福颗粒对 PLGC 防治作用的机制。

1 实验材料

1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠(合格证号:11400700193917)120 只,鼠龄 15d,体质量(120 $\pm$ 10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,适应性饲养 1 周。

1.2 药物与试剂 雷尼替丁(天津太平洋制药有限公司);N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG,日本 TCI 公司)。五丹胃福颗粒:中成药,5g/袋,购于天津中医药大学第二附属医院药房,批准文号:津药制字 Z200070656 号。大鼠用药量根据《药理实验方法学》人和动物间按体表面积折算的等效剂量算法确定为 0.375g/d,2 次/d。ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。

2 实验方法

2.1 模型制备 采用改良 MNNG+复合法进行造模^[6-7]。动物分笼饲养,室温 22℃,相对湿度 50%,每日自由饮用 167mg/L 的 MNNG 溶液,每 24h 更换 1 次药液,造模期间不再给予其他饮水,同时食用含 0.03% 雷尼替丁饲料,下午灌胃 0.017mol/L 浓度的 MNNG 溶液,每只每天灌液 1mL;造模期间每进食 2d,禁食 1d,连续 28 周。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2.2 动物分组与给药 MNNG+复合法造模成功大鼠 44 只,随机分为 4 组,分别为五丹胃福颗粒高剂量组 10 只(1.5g/d,2 次/d),五丹胃福颗粒低剂量组 10 只(0.375g/d,2 次/d),西药组 10 只(给予叶酸,2mL/次,2 次/d。用药量根据《药理实验方法学》人和动物间按体表面积折算的等效剂量算法确定),模型组 14 只(0.9% NaCl)。另取 10 只正常大鼠设为空白组,灌胃 0.9% 氯化钠注射液。均连续给药 12 周。(给药组每组 10 只、空白组 10 只全部存活,模型组剩余 10 只,死亡 4 只)

2.3 指标采集与检测 给药结束后取大鼠静脉血,采用双抗体夹心酶标免疫分析(ELISA)法^[8-9]检测血清 COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 水平。准备 ELISA 试剂盒,每孔添加 100 μ L 标准样品和样品。取出每个孔的液体,在每个孔中加入 100 μ L 的生物素抗体(1x)。每孔吸干,洗净,重复 2 次,共洗 3 次。每孔灌满水洗缓冲液(200 μ L),并让其保持 2min,最后一次清洗后,向各孔中添加 100pHRP-抗生物素蛋白(LX)。重复吸干/清洗步骤 5 次。向每个孔中加入 90 μ L TMB,37℃下孵育 15~30min,避光。将 50pL 停止液加到各孔中,确保混合均匀。使用微板阅读器,在 5min 内确定每个孔的光密度。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值),计算样品浓度。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件。组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以优势比(odds ratio,OR)及 95% 可信区间(Confidence Interval,CI)表示各指标之间的差异。

3 实验结果

各组血清 COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 含量比较,与空白组比较,模型组各项指标水平均升高,与模型组比较,药物治疗组各项指标水平均降低,差异均有统计学意义;五丹胃福高、低剂量组较西药组 COX-2、NF- κ B 水平高,五丹胃福低剂量组较西药组 TNF- α 、IL-1 β 水平高,差异均有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组血清 COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	COX-2(μ g/L)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	NF- κ B(pg/mL)
空白组	10	10.03 $\pm$ 0.77	443.55 $\pm$ 34.77	27.34 $\pm$ 2.73	12.66 $\pm$ 0.89
模型组	10	23.08 $\pm$ 1.87 ^a	1460.77 $\pm$ 60.30 ^a	81.61 $\pm$ 8.71 ^a	33.04 $\pm$ 2.26 ^a
五丹胃福高剂量组	10	15.3 $\pm$ 0.47 ^{bc}	1046.67 $\pm$ 44.19 ^b	53.61 $\pm$ 4.58 ^b	25.77 $\pm$ 1.31 ^{bc}
五丹胃福低剂量组	10	20.14 $\pm$ 0.68 ^{bc}	1300.87 $\pm$ 107.17 ^{bd}	67.93 $\pm$ 3.73 ^{bd}	30.99 $\pm$ 1.09 ^{bc}
西药组	10	16.7 $\pm$ 1.51 ^b	1018.40 $\pm$ 67.45 ^b	57.21 $\pm$ 3.89 ^b	24.44 $\pm$ 1.10 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与西药组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

4 讨论

本课题组前期研究已经证实五丹胃福颗粒对 PLGC 患者有较好地改善症状及病理逆转作用,本实验主要从非可控炎症角度研究其作用机制。

长期慢性的非可控性炎症可以诱导肿瘤的发生^[10]。核转录因子 NF- κ B 是炎症信号通路的分子开关,也是沟通非可控性炎症与肿瘤发生之间的“桥梁”。炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 均可激活 NF- κ B 炎症反应通路。肿瘤在发生的过程中也可直接刺激促炎因子的产生,如上调促炎细胞因子 COX-2 的表达^[11-12]。

五丹胃福颗粒为《医方考·卷六》所载的五磨饮子与《时方歌括·卷下》的丹参饮合方而成,由枳实、乌药、沉香、木香、丹参、砂仁等组成,具有理气通降、活血化瘀的功效。前期研究证实该方能明显兴奋实验小鼠小肠蠕动,调整慢性萎缩性胃炎(CAG)模型大鼠血清及局部胃黏膜氧自由基与抗氧化酶系统的平衡,减轻自由基对胃黏膜的损害^[2-5]。本实验结果显示,模型组大鼠 COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 水平较空白组大鼠表达高($P < 0.01$),说明 PLGC 的发生发展与炎症微环境息息相关,各治疗组与模型组比较,指标水平均降低($P < 0.01$)。叶酸已被临床证实一定程度上有逆转胃黏膜的萎缩、肠化和不典型增生作用^[13-15]。本实验发现五丹胃福颗粒与叶酸有相当的治疗作用,并且改善非可控性炎症的治疗作用高剂量组优于低剂量组。

本次实验研究证实 PLGC 与炎症微环境的关系密切,五丹胃福颗粒可通过改善 PLGC 炎症微环境相关指标,达到治疗 PLGC 的目的。

参考文献

[1] Correa P,Haenszel W,Cuello C,et al. A model for gastric cancer epidemiology[J]. Lancet,1975(2):58-60.
[2] 刘福林,李儒英,邵祖燕. 理气活血法治疗老年慢性萎缩性胃炎疗效观察[J]. 中国慢性病预防与控制,1999,7(4):183.

益气开胃膏质量标准研究

廖伟中¹, 李养学²

(1. 广东省广州市番禺区中医院, 广东 广州, 511400;

2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州, 510095)

[摘要] 目的:对益气开胃膏的质量标准进行提高研究。方法:采用TLC薄层色谱技术对益气开胃膏中黄芪、山楂、陈皮等中药进行薄层鉴别,同时采用HPLC高效液相色谱技术对方中黄芪甲苷的含量进行测定。结果:所建立的TLC法能较好地鉴别方中所含的黄芪、山楂、陈皮,斑点对应清晰,阴性无干扰;黄芪甲苷在1.0472~20.9440 μg 范围内呈良好的线性关系,黄芪甲苷平均回收率为99.50%,RSD为1.32%。结论:所建立的质量控制方法准确、专属性好,能较好地对益气开胃膏进行定性、定量检测,可用于益气开胃膏的质量控制。

[关键词] 益气开胃膏;黄芪甲苷;高效液相色谱法;薄层色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.08.083

Study on quality standard of Yiqi appetizer ointment

LIAO Wei-zhong¹, LI Yang-xue²

(1. Panyu Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, Guangdong, China;

2. Guangdong Provincial Institute of TCM, Guangzhou 510095, Guangdong China)

Abstract: objective: To develop improved quality standard of Yiqi Kaiwei ointment. Methods: identification of Radix Astragali Mongolici, Fructus Crataegi Pinnatifidae and Pericarpium Citri Reticulatae in Yi TLC method. The contents of astragaloside in the formula were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Results: The proposed TLC method was capable of identifying the three ingredients mentioned above, in which clear characteristic spots were obtained with no negative interferences. Astragaloside showed a good linearity in the range of 1.0472~20.9440 μg , the average recovery of astragaloside was 99.50%, RSD was 1.32%. Conclusion: The established quality control method was accurate and specific and can be used for qualitative and quantitative analysis of Yiqi Kaiwei ointment, as well as its quality control.

Key words: Yiqi Kaiwei ointment; astragaloside; TLC; HPLC

益气开胃膏是由广东省广州市番禺区中医院自主研发的中医膏方,主要由黄芪、山楂、鸡内金、党参、陈皮、稻芽、山药、红枣等12味中药经过煎煮、浓缩、收膏等工艺制备而

成,已在本院广泛使用,具有益气补血、开胃消食等功效。主要用于手术后失血过多、脾胃虚弱、不思饮食或倦怠乏力等症。目前益气开胃膏的质量控制仅有常规检查项,没有

- [3] 尚德师,李乐军,邵祖燕. 五磨饮子促进大鼠胃液分泌及保护胃黏膜等作用的实验研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(3): 588-589.
- [4] 尚德师,李乐军,邵祖燕. 五磨饮子调节大鼠胃运动的实验研究[J]. 陕西中医,2006,27(11):1436-1437.
- [5] 陆融. 五丹胃福冲剂治疗幽门螺杆菌相关性慢性萎缩性胃炎临床及试验研究[D]. 天津:天津中医学院,1996.
- [6] 李慧臻,刘琳,王兴章,等. 半夏泻心汤对胃癌前病变大鼠胃黏膜组织中的NF- κ B/STAT3信号通路的影响研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2017,25(4):284-288.
- [7] 谢晶日,王业莉,张扬,等. 复合造模法建立大鼠胃癌前病变模型的实验研究[J]. 新中医,2013,45(2):139-141.
- [8] 陈焕朝,冯觉平,魏少忠,等. IL-1基因多态性对胃黏膜TNF- α /NF- κ B的表达和活性的影响[J]. 肿瘤防治研究,2009,36(20):130-133.
- [9] 周海存,刘宏斌,苏琳. 胃癌患者血清VEGF、COX-2表达的检测

- 及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(9):2019-2021.
- [10] Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(11): 759-771.
- [11] Lyons JG, Patel V, Rous NC, et al. Snail upregulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes[J]. Cancer Res, 2008, 68(12): 4525-4530.
- [12] 李伟,王媛,熊正文,等. 环氧化酶-2与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 华国防医药,2010,22(3):277-280.
- [13] 刘丽华,吴汉平,张方信,等. 叶酸治疗萎缩性胃炎并改变P16蛋白表达[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(6):630-633.
- [14] 朱舜时,夏书军,陈晓宇,等. 叶酸治疗萎缩性胃炎并干预胃癌生成的分子生物学机制[J]. 胃肠病学,2002,7(2):86-89.
- [15] 李伟群,谢建群,龚雨萍,等. 叶酸治疗幽门螺杆菌感染慢性萎缩性胃炎疗效[J]. 中国临床医学,2014,21(5):523-525.

(收稿日期:2018-01-29)