



第三届海峡两岸 中西医结合学术研讨会

论文集

2005年8月13~16日 扬州

主办单位：中国中西医结合学会

台湾中西整合医学会

承办单位：扬州大学医学院



目 录

特邀报告

心肌梗死后的心室重构的实验病理研究和活血益气药对其治疗的药理研究	王硕仁	(1)
半枝莲抑制肿瘤血管生成的实验研究	卜平 张妮娜 沈维千	(8)
丹参饮促进胃溃疡愈合作用及其机理研究	张洪泉 柳丽	(11)
灸法医疗保健之考察	李春兴	(15)
从中西医学探讨内经、难经、中藏经三焦实质	王人澍 林昭庚 张贤哲等	(21)
从定性到定量的综合集成法在肝炎后肝硬化“病—证—效”结合临床研究中的应用	刘平 张琴	(28)

大会发言

丹参提取物调脂作用机制研究	薛洁 谢梅林 顾振纶	(30)
地龙提取物拮抗白三烯 D ₄ 的作用研究	谢强敏 史红 胡慧敏	(33)
黄芪多糖和小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢及细胞分化的影响	王文健 陈伟华 刘毅等	(37)
三七皂苷在造血细胞内 MAPK 信号传递途径的研究	高瑞兰 陈小红 林筱洁等	(39)
针刺肾俞穴对快速老化模型小鼠 (SAMP6) 骨组织形态计量学影响的实验研究	韩景献 韩宝杰 刘碌	(44)
大黄廑虫丸抗脂肪肝之实验研究	王煌辉 吴介信 许朝添	(47)
心血管病急重症中医病机治则与治疗方案新探讨——气虚血瘀毒邪病机和		
益气活血解毒治法研究	张文高 周苏宁 鹿小燕等	(47)
从人血白细胞中筛查冠心病血瘀证相关基因	王阶 杨保林 姜燕	(55)
针刺治疗脑心综合症患者疗效研究	傅立新 赵建国 李妍等	(57)
冬令温阳补肾膏方随访支气管哮喘 87 临床报告	吴银根 唐斌擎	(62)
中药血脂康对老年人群及糖尿病人群冠心病二级预防的研究	陆宗良 杜保民	(66)
益髓生血颗粒治疗 β -地中海贫血症临床与分子基础研究	吴志奎 张新华 柴立民等	(69)
消化系肿瘤术后中西医结合治疗——兼论中医辨证与西医辨病	王声球	(74)
围手术期研究是开展外科中西医结合的最佳结合点	马必生	(76)
清开灵注射液对早期缺血型糖尿病足坏疽治疗效应观察	王义成 曹烨民 吴伟达等	(82)
糖尿病足辨证分型与病理学相关性研究	张庚扬 范英昌 金树梅等	(85)
中西医结合治疗寻常痤疮 102 例疗效观察	李秀玉	(88)
针灸对提高小儿脑瘫生存质量的研究	刘振寰	(91)

骨骼畸形与晚发性佝偻病的关系探讨·····	林 岚	(94)
消癖散治疗乳腺增生 80 例临床观察·····	潘玉华 王立冬 牛小平	(97)
参芪地黄汤加减配合激素治疗复发性肾病综合征疗效观察·····	刘秀萍 秦 曼 于 梅等	(98)
试论张仲景应用活血化瘀药治疗杂病的特色·····	党 毅	(100)
我国中医临床研究的现状和评价·····	李廷谦 王 刚 毛 兵	(102)

会议交流

通腑活血汤对脑出血大鼠氧自由基作用的实验研究·····	刘 华 张国平 别晓东等	(107)
脑尔康对 AD 模型小鼠脑内 caspase-3 表达影响的实验研究·····	李 玺 袁海峰 张智燕	(107)
中药“狼疮 2 号”对系统性红斑狼疮模型小鼠皮肤和脾脏雌激素受体的影响 ·····	陈 宏 张京玲 倪春生	(108)
肝复康滴丸剂制剂工艺学研究·····	王建明 王和平 黄金勇等	(108)
参麻益智胶囊对大鼠脑微血管内皮细胞功能的影响·····	罗增刚 霍海如 李兰芳等	(108)
青紫薯色素对 $^{60}\text{Co } \gamma$ - 射线辐射小鼠胸腺淋巴细胞的保护作用及其机制 ·····	朱 莉 韩志武 于国英等	(109)
衰老肾虚证大鼠边缘系统-HPA 轴变化及补肾方药的作用·····	金国琴 徐品初	(110)
大黄抗脑缺血损伤的物质基础与作用机制·····	李建生	(111)
蛇床子素预防去卵巢大鼠骨质疏松形成的实验研究·····	鲍君杰 谢梅林 周 佳等	(111)
针刺对实验性脑出血大鼠不同脑区及心肌 ETmRNA 表达的影响 ·····	傅立新 赵建国 赵成彬等	(112)
扇贝糖胺聚糖对小鼠单核巨噬细胞氧化功能的影响·····	汪韶君 刘 赛 孙福生	(112)
姜黄素抑制慢性心力衰竭大鼠心肌 TNF α 、MMP-1、9 表达的实验研究 ·····	刘润侠 党慧敏 段中琪等	(113)
地黄提取物对 LPS 诱导大鼠肺部炎症的影响·····	邓杨梅 郑绪阳 杜晓钢等	(113)
隐孔菌发酵物对脾虚证哮喘小鼠气道高反应性及炎症的影响·····	包兆胜 李和权 邵传森等	(114)
三七皂苷诱导造血细胞基因表达谱的研究·····	高瑞兰 陈小红 林筱洁等	(115)
胃食管反流病 122 例证候病机分析·····	时 乐 卜 平 郑新梅等	(116)
哮喘落对小鼠哮喘模型嗜酸细胞凋亡影响的实验研究·····	张英兰 吴银根	(116)
复方止痒涂膜剂的研制和临床应用·····	虞绍铸 张霞玲	(117)
脂肝康胶囊对脂肪肝大鼠肝脏超氧化物歧化酶和丙二醛的影响 ·····	郑新梅 姜 惟 周 珉等	(117)
中西医结合治疗中老年冠心病 29 例·····	杨玉娥 王拥祠 王炳全等	(117)
通痹止痛汤合阿魏酸钠注射液治疗冠心病心绞痛 50 例临床观察·····	郭尧树	(118)
针刺治疗单纯性肥胖症伴便秘的疗效观察·····	陈 斌 胡少明	(118)

复方黄连降糖片防治糖尿病肾病的实验研究·····	宋菊敏 闫记灵 庞惠芳等	(118)
冠心通络胶囊治疗冠心病心绞痛临床观察·····	张崇泉 金幼兰 张炜宁等	(119)
针刺安神穴位治疗血管神经性头痛的临床观察·····	谷 巍	(119)
消痛祛风汤治疗痛风性关节炎的临床研究·····	郑国伟 林奕芬 陈少如	(119)
冠心病与血清胆红素和血脂的关系探讨·····	葛 昱 潘尚萍 武桂敏	(120)
脑部退行性变疾病与高脂血症和颈部硬化关系的探讨——附 21 例临床观察 ·····	陈国良 金 妹	(120)
浅谈抗消化性溃疡复发的中医药治疗·····	樊改英	(121)
正压通气加中药在急性肺水肿抢救中的应用·····	茹俊卿	(121)
中西医结合抗肝纤维化·····	卢俊卿 卢晶莹	(122)
消风散化裁治疗咽源性咳嗽 30 例·····	屠庆年 万宝俊	(113)
中医药治疗风湿性舞蹈病 9 例·····	张 平 李国良	(123)
推拿定点扳法根治神经根型颈椎病的机理分析·····	周 骥 丁全茂	(123)
强直性脊柱炎证(症)治·····	张自强 方泽志 汪方记等	(124)
浅谈如何提高中医骨伤科治疗力度·····	叶有厚	(124)
指屈肌腱狭窄性腱鞘炎非手术治疗的临床研究·····	王宇昌 何金山 潘明德	(124)
脑胶质瘤的中药基因治疗·····	王德修 鲍 锋	(125)
中西医结合治愈 16 例肺脓肿的体会·····	马岩松	(125)
中西医结合治疗烧伤的临床研究与实践·····	肖 摩	(125)
颅脑外科病人重症顽固性膈肌痉挛的中西医结合治疗·····	孙万凯 朱秀芝 王晓敏等	(126)
糖尿病患者泪膜功能的探讨·····	郝 进	(126)
复方苍耳油治疗萎缩性鼻炎的临床观察·····	韩桂亭 房学贤 刘 林等	(127)
急性侵袭性真菌感染治疗研究进展·····	吴绍熙 郭宁如	(127)
微波联合中药克疣煎及卡介菌多糖核酸治疗皮肤疣疗效观察·····	孙小勤	(128)
自拟带下方辨证治疗慢性盆腔炎 80 例·····	杨锡红	(128)
小金丹治疗乳腺囊性增生病 105 例临床观察·····	王俊峰	(128)
青蒿香薷水煎外洗治疗小儿外感发热的应用体会·····	李蕾华	(129)
普利莫防治儿童反复呼吸道感染的临床疗效观察·····	江文辉 周名秀 邓 力	(129)
中西医结合治疗婴幼儿腹泻·····	杨晓芬	(130)
系统性红斑狼疮心电图改变及中西医结合治疗疗效分析·····	何 英	(130)
承气类之特征与其形成、发展探析·····	朱德礼	(130)
从“道在器中”论中西医结合·····	匡调元	(131)
中药现代化研究的思考·····	王和平	(132)

· 特邀报告 ·

心肌梗死后的心室重构的实验病理研究和 活血益气药对其治疗的药理研究

王硕仁

中医内科学教育部重点实验室 (北京中医药大学)

北京市重点实验室 (中医内科学)

北京中医药大学东直门医院气血研究室 (北京 100700)

目的 研究心肌梗死后的心室重构的病理特点和活血、益气中医药干预心衰心气虚证及左室重构发展的作用。**方法** 结扎大鼠左冠状动脉致心肌梗死, 常规喂养, 术后第 9 周应用左旋精氨酸酶模型大鼠注射至第 12 周, 使血压升高, 心功能进一步恶化; 在术后第 10 天、第 8 周、第 12 周分别检测心功能、心室结构和进行心脏功能基因表达谱芯片检测。药理实验应用丹参、红花等活血注射液、党参、黄芪益气注射液和二者的联合 (气血组), 分别于大鼠心梗次日 (早期) 给药、疗程 4 周和 8 周以及心梗心衰后 4 周 (晚期) 给药, 疗程 4 周; 均以卡托普利为对照。**结果** 心梗 10 日内大鼠左室破坏延展性重构显著、心梗 10 日后至 8 周内心衰形成并稳定、左室呈增殖性重构; 活血和益气中药治疗心衰大鼠都改善了左室收缩功能、减小左室腔面积、抑制心肌胶原增殖、心肌 Ang II 含量和心肌细胞凋亡, 与模型组比较 $P < 0.05$; 其中, 早期活血组给药 8 周后改善心脏指数 (CI)、减小左室腔面积、降低心肌 Ang II 的结果与假手术组已无显著性区别, $P > 0.05$, 并且改善 CI 值显著好于晚期 4 周活血药组。活血组心肌细胞凋亡率显著少于益气药组。**结论** 不断发展的左室重构是不断恶化的心力衰竭的组织结构基础; 能够延缓、阻止、逆转左室重构就获得了阻止心力衰竭病理发展的基础条件。早期和长期应用活血化瘀中药可以取得较好治疗心力衰竭的效应。

【关键词】 急性心肌梗死; 左室重构; 活血中药; 益气中药

一、心室重构的概念

心室重构或重塑 (ventricular remodeling) 是由于心肌损伤 (包括心肌梗死、中毒、炎症和代谢异常) 或负荷增加所产生的心室大小、形状和组织结构的变化过程。

心室重构是病变修复和心室整体代偿及继发的病理生理反应过程, 心室重构是在一系列复杂的分子和细胞机制作用下导致了心肌结构、功能和表型的变化。这些变化包括: 心肌细胞肥大、凋亡, 胚胎基因和蛋白质的再表达, 心肌细胞外基质的量和组成的变化。临床表现为: 心肌质量、心室容量的增加和心室形状的改变 (横径增加呈球状)。

在组织学上, 心室重构涉及了心肌内的所有细胞, 包括心肌细胞、间质细胞和广泛的免疫细胞等。尽管引发心室重构的病因不同, 但心室重构的后果却是类似的: 都可引起心肌细胞之间的滑脱 (细胞的空间位置改变)、心肌细胞肥厚、广泛的细胞外基质增生和纤维化; 而在器官和组织水平上表现为心室腔、心室壁的形态、结构的异常, 最后导致心脏扩大、心力衰竭的发生和发展。即心室重构产生了 3

种病理形态上(心肌细胞、间质细胞、左室扩大)的变化。

临床中的左室重构,包括有同心性重构(concentric remodeling)、同心性肥大(concentric hypertrophy)和离心性肥大(eccentric hypertrophy)。左室肥大(left ventricular hypertrophy, LVH)与室壁增厚不同,左室肥大是左室心肌质量(mass)相对于身体表面积增加,即:左室心肌质量指数(LVMI)超过 $125\text{g}/\text{m}^2$ 。当左室室壁变厚,但不伴有LVMI增加时,这就成为同心性重构,该重构与压力负荷有关;当左室室壁和左室质量指数都增加时,则为同心性肥大,这种改变与其受到的持续性压力负荷有关;当左室容积增加,室壁厚度不增加时,则成为离心性肥大,该重构与左室受到持续性容积负荷有关。

冠心病由于心肌病变的不均匀性、不同步性,使得冠心病左心室重构的病变具有多样性和复杂性,包括缺血的损伤与修复。心室重构后所出现的导致心室扩大、肥厚的一系列病理形态变化,这些变化最终发展成为缺血性心脏病晚期的泵功能衰竭。

二、研究左室重构的意义——左室重构与疾病的转归

传统中医学强调人体的功能。中西医结合医学的任务之一就是将人体的功能学研究与人体的器官、组织、细胞的结构学研究结合在一起。药物有构效关系,生物体有“构效关系”,人体也有“构效关系”。

“心室重构是心力衰竭发生、发展的机制。”心力衰竭的治疗从原来的短期的、血流动力学/药理学措施,转变为长期的、修复性的策略,目的是为有利于改变衰竭心肌的生物学性质。应用神经内分泌拮抗剂(ACEI和 β 受体阻滞剂)阻断神经内分泌与心肌重构之间的恶性循环,是治疗的关键。

三、左室重构的临床诊断

1. 心肌梗死后的左心室重构诊断

心肌梗死后诊断左心室重构的方法同于冠心病心肌缺血过程的左心室重构的诊断方法。

急性心肌梗死心室重构的超声表现 急性心肌梗死后早期的左心室重构的主要特点是梗死膨胀,大体解剖所见:梗死区不成比例地变薄和拉长、局部内腔扩大和膨出,整个左心室(包括梗死区和非梗死区)形态和大小改变。显微镜检查可见心肌细胞间滑脱,即跨越心室壁的细胞数减少和梗死节段变薄。超声心动图显示AMI后数小时即发生急性心室重构,3~5天最重,3~6周内结束。

晚期重构可在AMI后6周至一年,呈进行性心室整体扩张。心肌梗死后恢复期直至形成陈旧心肌梗死,经超声心动图检查所见,原急性膨出表现为不同程度的恢复、梗死段内膜回声增强、增厚,心肌层变薄、周径延展。二维超声心动图可明确梗死的部位和范围。心肌梗死病人全面好转时,非梗死部位代偿性收缩加强;当代偿功能不全时,则出现全心扩大和功能减低。不同部位梗死时,左心室重构程度不同:面积较大的前间壁梗死,急性期心室即扩大,以后常继续扩张并合并心力衰竭;后壁心肌梗死若面积较小,左心室重构现象并不严重,心室容量可保持正常。

四、心肌梗死后左室重构的实验病理学研究

左室重构病理模型的建立方法 高位结扎SD大鼠左冠状动脉前降支,术后常规饲养。第十天应用阻抗法评价模型大鼠心脏功能,将心脏指数(CI)小于假手术组大鼠CI平均值40%以上者纳入心衰模型组、并常规饲料喂养。心衰模型组大鼠于术后第9周开始以左旋硝基精氨酸(L-NNA)100mg/kg/d灌胃一个月,造成其血压升高、心功能恶化。在以上实验过程中,分别于造模后10天、8周和12周进行模型组($n=6$)和假手术组大鼠($n=6$)的收缩期血压(SBP)、心脏每搏量(SV)、每分钟排出量(CO)和CI检测,心脏病理切片的组织学比较,并对上述3个时间点的模型组大鼠($n=2$)和假手术

组大鼠 (n=2) 的心脏进行功能基因表达谱基因芯片 (cDNA 芯片, 4096 点/张)。

结果 本研究所构建的大鼠模型是一个心衰心室重构动态的形成过程: 10 天、8 周和 12 周时模型组 SV 分别为 (0.05 ± 0.02) ml/beat, (0.10 ± 0.02) ml/beat 和 (0.11 ± 0.02) ml/beat; CO 分别为 (26.68 ± 10.97) ml/min, (40.15 ± 11.07) ml/min 和 (32.14 ± 9.31) ml/min; CI 分别为 (83.23 ± 19.95) ml/min/kg, (110.02 ± 30.57) ml/min/kg 和 (95.37 ± 26.44) ml/min/kg, 均显著低于同期假手术组 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。12 周时模型组大鼠 SBP 为 (163.58 ± 17.32) mmHg 显著高于同期假手术组 (97.36 ± 12.15) mmHg 和 10 天、8 周模型大鼠的 SBP。

模型组大鼠左室腔面积明显增大: 10 天、8 周和 12 周模型组大鼠心室腔面积分别为 (11.49 ± 2.648) mm²、 (14.92 ± 2.359) mm² 和 (18.01 ± 3.801) mm² 均比假手术组左室腔面积 $(4.72 \sim 9.07)$ mm² 显著性增大 ($P < 0.05$)。模型大鼠脏体比值 (心脏湿重/体重) 明显增大: 10 天、8 周和 12 周模型组大鼠脏体比值分别为 (3.22 ± 0.36) , (3.72 ± 0.29) 和 (4.17 ± 0.43) 它们均显著大于同期的假手术组 ($P < 0.01$)。模型组大鼠心脏变薄比 (梗死区室壁厚度均值/非梗死区室壁厚度均值) 明显小于假手术组: 10 天、8 周和 12 周模型组心脏变薄比分别为 (0.41 ± 0.04) , (0.29 ± 0.04) 和 (0.29 ± 0.03) , 它们均显著小于同期的假手术组 ($P < 0.01$)。

模型组大鼠心室肌胶原明显增殖: 10 天、8 周和 12 周模型组心脏病理切片的 Masson 染色, 其非梗死区的胶原光密度结果分别为 0.22 ± 0.05 , 0.24 ± 0.03 和 0.25 ± 0.03 ; 梗死区的胶原光密度在第 10 天和第 12 周都高于假手术组的 0.21 ± 0.00 。模型组大鼠心肌细胞凋亡率明显增多: 10 天、8 周和 12 周模型组梗死边缘区凋亡细胞百分率为 $(14.30 \pm 1.35)\%$, $(11.86 \pm 1.61)\%$ 和 $(18.30 \pm 2.34)\%$, 均显著高于同期假手术组; 同时 8 周和 12 周的模型组心室健存区细胞凋亡百分率也显著高于假手术组: $(6.17 \pm 0.21)\%$ vs $(0.62 \pm 0.04)\%$ 和 $(8.37 \pm 0.10)\%$ vs $(0.79 \pm 0.08)\%$ 。

模型大鼠心脏涉及能量代谢的基因表达显著下调, 而促进心脏间质纤维化和相关信号转导基因则呈显著上调, 并呈现梗死缺血区域和健存区域以及病变早期、中期的不同表达特点: 梗死缺血区 10 天增殖性基因占该时间点全部已知基因的 53% (下同), 8 周增殖性重构基因占 16%, 12 周增殖性重构基因占 21%; 非梗死缺血区 10 天增殖性基因占该时间点全部已知基因的 39% (下同), 8 周增殖性重构基因占 40%, 12 周增殖性重构基因占 36%。其中无论在梗死缺血区还是非梗死区, 在上述 3 个时间点中, $\alpha 2(I)$ 型原胶原 mRNA (procollagen, type I, $\alpha 2$ mRNA)、前 $\alpha 1(III)$ 型胶原蛋白 mRNA (pro $\alpha 1$ collagen type III mRNA)、纤连蛋白 1 mRNA (Fibronectin 1 mRNA)、金属蛋白酶组织抑制 mRNA (tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA) 共同呈显著性上调。

药理学实验 活血注射液由丹参、红花、川芎、赤芍药组成, 每毫升相当于生药 2g; 益气注射液由党参、黄芪组成, 每毫升相当于生药 2g; 气血注射液由活血和益气注射液组合而成, 每毫升含生药 4g。卡托普利由常州制药厂生产。实验前配制卡托普利溶液, 每毫升含卡托普利 3mg。

早期给药: 按前述方法制作模型后第二天、即开始随机分为活血组、益气组、气血组、卡托普利组给药, 疗程 4 周和 8 周。**晚期给药:** 造模后常规喂养四周, 经检测为心衰后随机分组, 进行上述药物治疗, 疗程四周。

各期各组均经腹腔注射: 模型组和假手术组每日给予与治疗组等量的生理盐水; 活血组、益气组、

气血注射液组每日均按 4ml/kg 剂量给药；西药组每日按 10.125mg/kg 剂量给予卡托普利。

给药结束后，从心脏功能、脏体比值、左室腔面积、室壁变薄比、单位面积心肌细胞核数、心肌单位面积内胶原含量、梗塞边缘区心肌细胞凋亡阳性率、心肌 Ang II 等方面观察活血、益气中药对心室重构的防治作用以及疗效与用药的时间窗和疗程的关系。

实验药理学结果表明：各药物治疗心衰大鼠都改善了左室收缩功能、降低脏体比值（见表 1）、减小左室腔面积、改善室壁变薄比（见表 2）、提高单位面积心肌细胞核数（见表 3）、减少心肌细胞凋亡（见表 4）、抑制心肌胶原增殖、减少心肌组织 Ang II 含量（见表 5），这些指标与模型组比较均有显著好转， $P < 0.05$ 。

但早期活血组给药 8 周后改善心脏指数（CI）、减小左室腔面积、降低心肌组织 Ang II 的结果与假手术组已无显著性区别， $P > 0.05$ ，并且早期活血组给药 8 周改善 CI 值显著好于晚期 4 周活血药组。活血组心肌细胞凋亡率也都显著少于益气药组。实验结果提示：早期和长期应用活血化瘀中药可以取得较好阻止心力衰竭心室重构的作用。

表 1 早、晚期不同疗程给药组脏体比值的比较 ($\bar{X} \pm S$)

组 别	早期 4 周 (n=6)	早期 8 周 (n=6)	晚期 4 周 (n=8)
假手术组	2.47 ± 0.24**	2.39 ± 0.27**	2.40 ± 0.18*
模 型 组	3.38 ± 0.37	3.72 ± 0.29	4.04 ± 0.46
活 血 组	2.84 ± 0.25**	2.67 ± 0.26**	3.15 ± 0.51*
益 气 组	3.11 ± 0.26	2.94 ± 0.28**	3.36 ± 0.64 *
气 血 组	3.07 ± 0.29*	3.02 ± 0.28**	2.95 ± 0.50*
卡托普利组	2.98 ± 0.28	2.73 ± 0.26	3.26 ± 0.58*

注：与模型组比较 * $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

实验结果还显示：各治疗组动物左室腔面积均显著小于模型组；同时早期持续 8 周活血药组左室腔面积 ($8.37 \pm 0.500 \text{mm}^2$) 和早期卡托普利 8 周组左室腔面积 ($9.02 \pm 1.200 \text{mm}^2$) 与假手术组 ($7.05 \pm 1.006 \text{mm}^2$) 未表现出显著性差异， $P > 0.05$ 。

对于左室变薄比，实验结果显示：各治疗组动物左室变薄比均显著大于模型组；同时各治疗组动物左室变薄比又都显著小于假手术组 ($P < 0.01$)。早期 4 周活血组左室变薄比小于早期 8 周，见表 2。

表 2 早期不同疗程给药组室壁变薄比的比较 ($\bar{X} \pm S$)

组 别	N	早期 4 周	早期 8 周
假手术组	6	0.99 ± 0.09**	0.97 ± 0.05**
模 型 组	6	0.35 ± 0.04	0.29 ± 0.04
活 血 组	6	0.50 ± 0.05**	0.61 ± 0.05**
益 气 组	6	0.59 ± 0.05**	0.53 ± 0.07**
气 血 组	6	0.54 ± 0.08**	0.54 ± 0.04**
卡托普利组	6	0.57 ± 0.09**	0.60 ± 0.08**

注：与模型组比较 ** $P < 0.01$

对于动物单位面积心肌细胞核数，实验结果显示：各治疗组动物单位面积心肌细胞核数均显著多于模型组；同时又都仍显著少于假手术组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 早、晚期不同疗程给药组单位面积心肌细胞核数的比较 ($\bar{X} \pm S$)

组 别	早期 4 周 (n=6)	早期 8 周 (n=6)	晚期 4 周 (n=6)
假手术组	853.90±78.52**	867.05±90.17**	815.80±110.53*
模 型 组	673.04±71.48	610.13±69.72	673.67±83.59
活 血 组	750.34±80.01*	770.18±68.25*	759.61±42.89*
益 气 组	743.21±79.24*	754.32±71.27*	742.43±62.615*
气 血 组	729.44±77.27*	747.18±80.46*	762.52±63.48*
卡托普利组	752.76±76.45*	769.24±77.23*	769.33±60.83*

注：与模型组比较 *P<0.05, **P<0.01

对于动物梗塞边缘区心肌细胞凋亡率，实验结果显示：各治疗组动物梗塞边缘区心肌细胞凋亡率均显著少于模型组；活血组心肌细胞凋亡率均显著少于同疗程益气组 (P<0.05)。同时各治疗组心肌细胞凋亡率仍显著多于假手术组。见表 4。

表 4 早期给药组梗塞边缘区心肌细胞凋亡阳性率的比较 ($\bar{X} \pm S$)

组 别	N	早期 4 周 (%)	早期 8 周 (%)
假手术组	6	1.66±0.94**	1.44±0.43**
模 型 组	6	10.45±1.80	11.86±1.61
活 血 组	6	7.43±0.79*	6.37±0.56*
益 气 组	6	10.41±1.38#	9.97±1.23**
气 血 组	6	9.82±1.29	8.39±0.62*
卡托普利组	6	8.39±1.42*	6.25±0.70*

注：与模型组比较 *P<0.05, **P<0.01

与同疗程活血组比较：#P<0.05

对于心肌单位面积内胶原含量，心肌病理切片分析结果显示：各治疗组心肌单位面积内胶原含量（以胶原免疫组化着色面积 μm^2 表示）均显著少于模型组；同时又都仍显著多于假手术组 (P<0.05)。

对于心肌组织 Ang II 含量，实验结果显示：各治疗组心肌 Ang II 均显著少于模型组；同时活血组、卡托普利组与假手术组比较无显著性差异。见表 5。

表 5 早期不同疗程给药组心肌组织 Ang II 的比较 (ng/g 组织, $\bar{X} \pm S$)

组 别	早期 4 周 (n=7)	早期 8 周 (n=7)
假手术组	0.72±0.37**	0.65±0.12**
模 型 组	1.71±0.37	1.68±0.54
活 血 组	1.03±0.21**	0.84±0.16**
益 气 组	1.15±0.28**	0.88±0.14**
气 血 组	1.52±0.40	1.09±0.18**
卡托普利组	1.00±0.15**	0.68±0.16**

注：与模型组比较 *P<0.05, **P<0.01

心肌细胞药理学研究 我们研究组在培养的乳鼠心肌细胞和心脏成纤维细胞中分别加入血管紧张素 II (Ang II)，观察两种细胞的总蛋白质、细胞直径和细胞数量；建立了血管紧张素 II 致心肌细胞肥大和心脏成纤维细胞增殖的模型。在此基础上，选用丹参有效成分丹参素、川芎有效成分川芎嗪、黄

芪注射液以及党参和党参加丹参的含药血清,以阳性药 Losartan 为对照,进行对血管紧张素 II 致心肌细胞肥大和心脏成纤维细胞增殖的实验药理学研究。

研究结果 Ang II 加 Losartan 组和 Ang II 加丹参素大、中、小剂量组、Ang II 加川芎嗪大、中、小剂量组分别减少心肌细胞总蛋白质含量、心肌细胞直径,说明 Losartan、丹参素和川芎嗪均有抑制 Ang II 引起心肌细胞肥大的作用,且丹参素、川芎嗪均呈一定的量效关系。各组心肌细胞数量无明显差异。而益气药党参、黄芪和党参加丹参组无此作用

实验结果也表明 Losartan、丹参素大、中、小剂量组和川芎嗪大、中、小剂量组还可以显著抑制 Ang II 增加心肌成纤维细胞数量的作用,丹参素、川芎嗪对这种作用均呈一定的量效关系。而益气药党参、黄芪和党参加丹参组无此作用。

应用 Fura-3 荧光染料,用流式细胞仪检测心肌细胞和心脏成纤维细胞内钙离子浓度,结果表明:丹参素和川芎嗪不仅明显抑制血管紧张素 II 诱导心肌细胞内钙离子浓度的升高,同时也明显抑制血管紧张素 II 诱导心脏成纤维细胞内钙离子浓度的升高,说明丹参素和川芎嗪可能有一定的钙拮抗作用,抑制血管紧张素 II 所介导引起的细胞内钙离子升高,从而抑制心肌细胞肥大和心脏成纤维细胞增殖。

Ang II 能诱导心肌细胞凋亡,Ang II 与空白对照组相比,显著增加心肌细胞凋亡率 ($P < 0.01$),并随着时间的延长其凋亡率不断增高,于第 7 天其达到高峰;losartan 明显抑制 Ang II 所诱导各个时间段的心肌细胞凋亡率 ($P < 0.01$),而活血药的有效组分丹参素和川芎嗪也明显抑制 Ang II 所诱导各个时间段的心肌细胞凋亡率 ($P < 0.05$)。活血药丹参素和川芎嗪能通过抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡而产生心肌保护作用。

Ang II 可显著增加胶原 I 的表达 ($P < 0.01$),而 Losartan 可明显抑制 Ang II 所诱导的胶原 I 表达 ($P < 0.01$),而丹参素也可减少胶原 I 的表达 ($P < 0.01$),川芎嗪无统计学意义,但有减少胶原 I 的趋势。Ang II 同时也增加胶原 III 的表达,Losartan 可明显抑制 Ang II 所诱导的胶原 III 表达 ($P < 0.01$),丹参素和川芎嗪也可减少胶原 III 的表达 ($P < 0.05$)。

总结已上研究结果,我们可以初步获得下述活血药(丹参、川芎)与益气药(黄芪、党参)在治疗心脏重构中的作用特点及其比较。

表 6 丹参、川芎与黄芪、党参在治疗心脏重塑中的作用特点比较

	左室重塑(心肌细胞肥大、 成纤维细胞增殖)	心肌细胞凋亡	显效时间
益气药	+	+	快
活血药	+	++	慢

讨论

1. 心肌梗塞心力衰竭的病理过程:存在着两种形式的心室重构:早期的心肌坏死及间质破坏性改建,中后期的心肌增殖和间质增生性改建。心室重构过程发生着心肌细胞数量、功能、心室肌量、心室容量的改变。从本实验的结果可以看到:大鼠被结扎冠状动脉到手术后 10 天内发生的心室壁变薄比以第 3 天最大、心室腔面积增大率以第 5 天最高(192%)、脏体比值第 10 天最小;这些数值均为本实验中的峰值或谷值,是心肌梗塞心力衰竭早期的心肌坏死及间质破坏性改建的标志。由于脏体比值表示着心脏肌量的多少,造模第 3、5 天该值的高水平和 10 天后该值的高水平具有不同的内涵:前者可因组织水肿而心脏重量增加、后者是因心室肌量(包括心肌细胞增殖和间质增殖)的增加。本研究结

果的第8周左室单位面积内心肌细胞核数的减小和单位面积内胶原含量的增大即是中后期的心肌增殖和间质增殖的证明。Sun等对心梗后大鼠心脏血管紧张素酶(ACE)结合活性的研究发现:ACE结合活性自梗塞后第1周开始升高、第2、4、8周更明显升高。Sun等的研究结果与我们对两种形式心室重构的时期划分大致相同。而且也成为我们实验现象的发生机制之一。

细胞凋亡的发现是现代生命科学的重大事件,是当代细胞生物学的重要研究内容。心室重构是心力衰竭的病理生理概念的最重要更新,其内容涉及了心肌细胞和间质细胞的大小、数量、分布的改建以及二者比例的改建。心肌细胞凋亡是心力衰竭中心肌细胞数量减少的重要构成:在缺血边缘区和健存区都有心肌细胞的凋亡;但是它发生在心力衰竭全过程中的时间特点尚未见报告。我们发现在心肌梗塞所致的心力衰竭中,大量的心肌细胞凋亡出现于心肌梗塞的早期和心力衰竭的恶化或后期。心功能的恶化是心脏结构破坏性改建和不良性增殖的结果。

2. 心肌梗死心衰大鼠模型的心脏基因表达谱实验提示:在心肌梗死后的心衰形成期、稳定期和恶化期中,模型大鼠的心脏梗死区内,有关能量代谢的基因呈显著低表达并且其数量多,而反映心脏受损的基因和心肌间质纤维化的基因呈显著上调表达,这种一低、两高的基因群表现特点提示着分子病理学意义上的邪实正虚,这种提示会对治疗法则的主要内容和主要靶点给予重大影响。

在心衰的形成期、稳定期和恶化期,模型大鼠的心脏非梗死区内显著上调表达的基因较集中于细胞骨架、心肌间质纤维化类基因和与之相关的信号转导基因,而且它们发生的开始时间在早期既有,并且数量多余8周和12周;健存区的这种早发生的增殖病理现象令人警觉:以往临床对于纤维化、慢性增殖性疾病的反应是不是比较缓慢?防治的起步工作是不是落后于疾病的客观病理发展?“善工治未病”应是我们防治和逆转慢性充血性心力衰竭心室重构的战略思想的指导。

3. 针对心衰中的最基本的病理条件,我们早期并长期(8周)应用活血化瘀中药取得了显著抑制心衰心肌重构的作用:活血组心衰大鼠第8周的心室腔面积最小、并与假手术组和卡托普利组无显著区别, $P>0.05$;该组脏体比值最小、并甚至还小于晚期用活血药4周组, $P<0.05$;该组心肌细胞凋亡最少、并显著少于模型组和益气组 $P<0.05$;该组单位面积内心肌细胞核数显著增多、胶原含量显著减少,分别与模型组比较 $P<0.05$;而早期活血组心衰大鼠第8周SV、CO、CI等血流动力学指标显著好于晚期给药、疗程4周的活血药组, $P<0.05$;并与假手术组无显著性差异, $P>0.05$ 。虚则补之的单纯补益可以在某一时期改善心衰的血流动力学和心室重构的某些指标,但其改善心室重构的程度与假手术组、活血组相比仍显有一定差距。

这一研究结果的意义是:针对心衰中的最基本的病理条件——血瘀,早期、并长期应用活血化瘀中药就使我们获得了阻止进行性恶化的心衰心室重构的机会。邪去正自安。血是气之母、血可载气。消除心衰病程发生、发展的基本条件和次生、再生的继发条件,才能阻止、逆转充血性心力衰竭不断恶化的病程。中药药效除具有量效关系外,还具有重要的时效关系。

参考文献(略)

半枝莲抑制肿瘤血管生成的实验研究

卜 平 张妮娜 沈维干

扬州大学医学院中西医结合研究所(扬州 225001)

近来抗血管生成成为肿瘤治疗领域的热点问题。目前国内外临床不乏有效的抗血管生成药物,但大多有效药物在抑制血管生成的同时带来了不可抵抗的副作用,如出血/凝血异常,加剧心血管疾病,影响成年妇女卵泡发育、正常的月经周期等,因而限制了其临床应用。鉴于大多天然药物毒副作用小,我们从临床有效方药中拆方筛选出有效肿瘤血管生成抑制药物半枝莲,初步探讨其抑制肿瘤血管生成的机理。

材料与方法

1. 材料

1.1 动物及细胞株:健康成年家兔8只,雌雄各半,体重(2.5 ± 0.3) Kg,昆明小鼠18只,雌性,体重(17 ± 3)g,均由扬州大学医学院动物房提供;荧光素报告基因质粒(5×HRE/pGL3/VEGF/E1b), β -半乳糖苷酶表达质粒,人宫颈癌细胞株 HeLa 由扬州大学医学院沈维干副教授惠赠。

1.2 材料及试剂:半枝莲(镇江)购自扬州市医药公司;人新鲜脐带由江苏省苏北人民医院产科提供;transwell 培养小室为美国 Corning 产品;鼠尾胶原 I 型,Matrigel 美国 BD 公司产品;碱性成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)、内皮细胞生长支持物(endothelial cell growth supplement, ECGS)、I 型胶原酶均为美国 Sigma 公司产品;内皮细胞 vWF 因子相关抗原兔抗人多克隆抗体免疫组化试剂盒、人 VEGF ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。荧光素酶分析试剂盒、细胞裂解缓冲液为美国 Promega 公司产品;ONPG(邻硝基苯- β -D-半乳糖苷)购自上海生工生物工程公司

2. 方法

2.1 药物血清的制备:健康成年家兔8只随机分为2组喂养,半枝莲组 $32\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连用2天;空白血清组喂生理盐水,第三天末次给药(禁食不禁水)后1小时无菌环境下心脏采血,1500rpm离心15min,分离上层血清,同种血清混匀,56℃,灭活30min,0.22 μm 滤膜抽滤分装,-20℃保存。

2.2 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)的原代培养和鉴定:参考Liu等方法,加以改进。无菌条件下取剖腹产新生儿脐带约20cm, I型胶原酶37℃消化15min,离心收集HUVEC, M199培养基(含20%胎牛血清,青霉素 $1 \times 10^5 \text{U L}^{-1}$,链霉素 100mg L^{-1} , L-谷氨酰胺 2mmol L^{-1})于37℃,体积分数0.05 CO_2 培养箱中培养。传代细胞培养基加入 50ng ml^{-1} ECGS, 2~8代用于实验测定。鉴定采用免疫细胞化学ABC方法检vWF因子相关抗原。

2.3 体外小管形成实验:将 I 型胶原稀释为 1mg ml^{-1} 调整 PH=7.0 包被 24 孔板,37℃聚合 1 小时, HUVEC 以 $2 \times 10^5 \text{ml}^{-1}$ 密度接种, 16h 后铺第二层胶原, 聚合后加入 10%、20%、40% 药物血清与无血清 M199 培养液混匀(空白血清作为空白对照), 终体积 1ml, 每组 4 孔, 体积分数 0.05 CO_2 , 37℃培养 18h, 100 倍 Olympus 倒置显微镜下观察小管形成的情况, 每孔取 5 个视野计数小管形成数, 取平均值。

2.4 肿瘤细胞分泌 VEGF 蛋白检测: 10%、20%、40%半枝莲含药血清组及空白血清组分别作用 12h、24h、48h 的 HeLa 细胞取 $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 密度种植 24 孔板, 无血清培养液作用 24h 后取上清, -70°C 保存。具体方法参照 ELISA 试剂盒说明书, 每个标本复 3 孔。

2.5 细胞 HIF 蛋白表达的检测: ECV-304 细胞接种 6 孔板至 70%汇合, 采用常规磷酸钙方法转染质粒 5×HRE/pGL3/ VEGF/E1b (pSV- β -gal 用于校正转染效率), 37°C , 5% CO_2 条件下培养 16h 后换液, 按 10%, 20%, 40%体系加入半枝莲含药血清, 设同浓度空白对照组。37℃缺氧培养培养 24 小时后裂解细胞, 取 30ul 细胞裂解上清与 3ul $100 \times \text{Mg}^{2+}$ 、66ul ONPG、201ul 0.1mol/l 磷酸钠混合液相混合, 对照组加入 30ul 细胞裂解液, 37°C 水浴 30min, 至颜色变黄, 分光光度计 420nm 波长读取光密度值得 β -半乳糖苷酶活性。另取 20ul 细胞裂解上清与荧光素酶作用底物混匀, 荧光粒子计数器中计数 10s 内的荧光光子。计算标化荧光素酶活性, 公式如下:

荧光素酶活性=各测试管光子数/ β -半乳糖苷酶含量

本次实验每个剂量水平有三个平行样品孔, 标化后的荧光素酶活性值用均数表示。

2.6 统计方法: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS8.0 软件, 主要方法为 t 检验。

结 果

1. HUVEC 的原代培养与鉴定: 原代 HUVEC 镜下呈铺路石状或扁平多边形镶嵌排列。经 SABC 免疫组化染色检测 vWF 因子抗原, 原代培养的 HUVEC 胞浆内均有棕色沉淀, 并以核周最为明显, vWF 因子抗原检测内皮细胞阳性率 $>90\%$ 。

2. 半枝莲对体外小管形成的影响: 空白血清在各个浓度组都可形成密度较高的小管, 且随浓度增加小管长度也有所增加。半枝莲含药血清体系为 20%时, 对小管形成即有明显影响, 不仅小管数目减少, 而且管腔不完整; 浓度为 40%时, 几乎无小管形成。10%体系半枝莲含药血清与同浓度空白血清比没有显著差异, 20%, 40%体系每个视野下小管形成数与同浓度对照组相比, 差异有显著性 (表 1)。

表 1 不同浓度半枝莲对内皮细胞小管形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组 别	浓 度	n	小管个数 (个·视野 ⁻¹)
对 照 组	10%	4	11 ± 1.6
	20%	4	9.8 ± 1.3
	40%	4	13.4 ± 1.1
半枝莲组	10%	4	9.8 ± 0.8
	20%	4	$5.6 \pm 1.1^*$
	40%	4	$1 \pm 0.7^*$

注: * $P < 0.01$, 与对照组同浓度相比

3. 半枝莲对肿瘤细胞分泌 VEGF 的影响: 同一时间段与空白血清组相比, 40%含药血清作用 24 小时, 48 小时后能明显抑制肿瘤细胞 VEGF 因子的表达, 具有显著差异 (表 2)。

表2 半枝莲对 HeLa 细胞培养上清 VEGF 含量的影响

组 别		VEGF ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
		10%	20%	40%
空白血清组	12h	218.64 $\pm$ 38.40	211.19 $\pm$ 22.28	222.34 $\pm$ 25.01
	24h	189.95 $\pm$ 13.53	197.40 $\pm$ 23.90	195.82 $\pm$ 2.43
	48h	188.33 $\pm$ 36.22	205.93 $\pm$ 51.13	193.68 $\pm$ 18.37
含药血清组	12h	213.32 $\pm$ 14.43	184.65 $\pm$ 21.53	183.03 $\pm$ 28.77
	24h	166.02 $\pm$ 13.62	151.60 $\pm$.93	138.67 $\pm$ 9.50**
	48h	173.48 $\pm$ 16.08	123.67 $\pm$ 35.68	93.84 $\pm$ 41.11*

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与同一时间段对照组同浓度相比

4. 半枝莲对内皮细胞 HIF 蛋白表达的影响: 将空白对照组各浓度荧光素酶活性设定为 100%, 计算半枝莲组荧光素酶相对活性。结果显示 20% 和 40% 浓度的半枝莲含药血清均能有效抑制荧光素酶活性, 与空白对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$)。

讨 论

半枝莲之名见于蒋仪《药镜拾遗赋》, 为唇形科狭叶韩信草的全草, 性辛、苦、寒, 具有清热解毒, 活血化痰, 消肿止痛等功效。中医常用于治疗各种感染、黄疸性肝炎、并用单方或复方治疗各种肿瘤。高冬等认为半枝莲能显著提高 HeLa 细胞内游离钙的浓度从而诱导肿瘤细胞的凋亡 Shanshan Wang 等发现半枝莲提取物能明显抑制鸡胚绒毛尿囊膜中的血管生成。

血清药理学方法提高了中药药理研究的可信度, 比较接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程, 理论上更具备科学性、真实性。本研究采用血清药理学方法获得半枝莲单味中药含药血清, 建立人脐静脉血管内皮细胞体外小管形成模型, 从形态学上研究了半枝莲具有显著的抗血管形成作用。VEGF 在人类的肿瘤血管新生和生长过程中是一种主要因子, 在多种恶性肿瘤 (包括胃癌、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和脑癌等) 中表达水平显著增高, 并与肿瘤的微血管密度、恶性程度以及转移密切相关。本研究显示半枝莲能抑制肿瘤细胞表达 VEGF 蛋白的量, 但没有明显的量效关系。HIF-1 是介导肿瘤细胞对缺氧微环境进行适应性反应的关键性转录调节因子, 其表达和活性对维持肿瘤细胞能量代谢, 促进肿瘤细胞增殖和肿瘤血管生成具有重要作用。缺氧环境中 HIF-1 能特异性结合到缺氧诱导基因启动子或增强子的缺氧反应元件 5'-RCGTG-3' 上, 参与相应靶基因的转录调控。这些基因包括 VEGF、一氧化氮合酶、促红细胞生成素等。本研究在明确半枝莲含药血清能抑制肿瘤细胞 VEGF 表达的前提下, 进一步探讨半枝莲对细胞信号传导通路 VEGF 上游因子 HIF 的影响。本实验发现, 半枝莲降低 HIF-1 驱动的荧光素酶报告基因的表达水平, 因而可能会抑制下游 VEGF 蛋白合成, 从而减少促血管生成因子的相应生物学效应, 起到阻断肿瘤血管生成的作用。

但体外细胞分子水平的研究不能代替体内实验, 我们正在进行半枝莲干预移植瘤动物模型的整体研究。

参考文献 (略)

丹参饮促进胃溃疡愈合作用及其机理研究

张洪泉 柳 丽

江苏扬州大学医药研究所 (扬州 225001)

丹参饮是我国传统著名古方,由丹参、檀香、砂仁三味药组成,主治气滞血瘀结于心胃的心脘腹疼痛,已有众多临床研究表明丹参饮对消化性溃疡具有较好的疗效。目前对胃溃疡的发生机制多认为与攻击因子和防御因子的失衡有关,本组前期研究发现,在幽门结扎型胃溃疡模型中,丹参饮对胃酸、胃蛋白酶这两个主要攻击因子无明显影响,本实验着眼于研究丹参饮对胃粘膜部分防御因子的影响,并观察其对胃粘膜细胞凋亡的作用,深入探讨其抗溃疡的可能作用机制。

1. 材料和方法

1.1 动物 清洁级健康 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重 180 g ~ 220 g,由中国科学院上海实验动物中心提供,合格证号: SCXK (沪) 2002-0010。

1.2 药品与试剂 丹参饮水提醇沉液 (每毫升相当于 1g 生药量),檀香、砂仁挥发油,由中国药科大学生药教研室提供,临用前以每 250mL 丹参饮水提醇沉液配檀香、砂仁挥发油各 2mL 的比例,用吐温-80 研磨混匀使用。NO 试剂盒 (南京建成生物工程有限公司生产)。PGE₂ 放免试剂盒 (苏州大学医学院提供)。阿尔新蓝 (alcian blue 8GX),上海华舜生物工程有限公司,进口分装,批号: 1298.88。多聚赖氨酸,美国 Sigma 公司。原位细胞凋亡检测试剂盒 (POD),华美生物工程公司产品。兔抗 Bcl-2、EGFR 相关抗原多克隆抗体, SABC 免疫组化染色试剂盒, DAB 显色试剂盒,均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 模型制备 大鼠乙酸性胃溃疡模型制备参照 Obake 法进行。大鼠禁食不禁水 24h 后,3%戊巴比妥钠 1mL/kg 腹腔注射麻醉,无菌操作,自剑突正中向下沿腹中线剪约 2cm 开口,轻轻拉出胃,将直径 5mm 长 30mm 的玻璃管垂直放于胃前壁窦体交界浆膜面上,向管内加入 100%冰醋酸 0.1mL,接触 1min 后用棉签吸干,生理盐水冲洗后,将胃轻轻送回,并以大网膜包裹,逐层缝合腹膜、腹壁肌层及皮肤,再次消毒。手术成功后将动物随机分为 4 组,每组 8 只,分别为正常组、模型组、丹参饮小、中、大剂量组,另 8 只未手术为正常组。术后正常饲养,第二天开始灌胃给药,分别给予生理盐水 0.1mL/kg (正常组和模型组)、丹参饮 1.75g/kg、3.5g/kg 和 7g/kg,每天一次,连续 14d。

1.4 标本采集 末次给药前大鼠禁食不禁水 24h,末次给药 2h 后,摘眼球取血 4mL。于不抗凝试管中注入 2mL,离心取上清,用硝酸还原酶法检测血清 NO;余血 2mL,放入预先加有 0.1mL 消炎痛-EDTA-Na₂ 液的抗凝试管内,混匀,4℃离心取上清,-20℃冻存,于江苏省苏北人民医院进行血浆 PGE₂ 检测,均严格按照试剂盒说明进行。大鼠取血后,予戊巴比妥钠过剂量深麻醉处死,剖腹,结扎幽门、贲门,胃内注入 1%甲醛溶液 8mL,摘出整个胃并置于 1%甲醛溶液中固定 10min。沿胃大弯剪开,冲洗后展开平铺,观察胃溃疡情况,测量胃溃疡的最大长径和垂直于长径的最大短径,将两者的乘积作为溃疡指数 (ulcer index, UI)。切下含溃疡边缘约 3mm 组织在内的溃疡组织块,沿溃疡长径的中点纵切将之一分为二,投入 10%的中性甲醛中固定 24h,常规石蜡包埋,4μm 厚连续切片,用于 AB-PAS 染色、

细胞凋亡检测和免疫组化染色。

1.5 胃壁结合粘液含量的测定 取乙酸性胃溃疡模型中胃壁组织,中性甲醛固定,脱水,常规石蜡包埋,制备 $5\mu\text{m}$ 厚连续切片,用于 AB-PAS 组化染色。染色步骤如下:① 预先配制好 AB 液 (PH2.5) 和 Schiff 氏染液;② 切片脱蜡至水;③ AB 液染色 25min,蒸馏水洗 2min;④ 1%过碘酸氧化液 8min,充分蒸馏水洗;⑤ Schiff 氏液暗处滴染 20min,流水冲洗 3min;⑥ 苏木素轻度复染;⑦ 梯度乙醇脱水,透明,封固。结果判定:酸性粘液物质呈蓝色,中性物质呈红色,中性和酸性混合物呈紫色。

1.6 细胞凋亡检测 采用末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 介导的脱氧三磷酸尿嘧啶 (dUTP) 末端标记法 (即 TUNEL 法) 检测细胞凋亡,操作程序按照试剂盒说明书进行。结果判定:凋亡细胞核内呈现棕黄色颗粒,每张切片随机选取 5 个高倍视野 ($\times 400$),由瑞医病理图文分析系统计算 1000 个粘膜上皮细胞中的阳性细胞数,以 100 个细胞中的阳性细胞数作为凋亡指数 (AI),取其均值作为该片的代表值。

1.7 免疫组化染色 Bcl-2、EGFR 蛋白表达检测:采用 SABC 免疫组化染色法检测,一抗分别为兔抗 Bcl-2、EGFR 多克隆抗体,稀释度均为 1:100,阴性对照以 PBS 代替一抗,用已知阳性片做阳性对照。结果判定:阳性细胞核膜、胞浆着色均为棕黄色,应用瑞医病理图文分析系统进行图象半定量分析,每张切片随机选取 5 个高倍视野 ($\times 400$),分别测定其平均积分光密度值和阳性细胞所占面积百分比,分别取其均值作为该片的代表值。

1.8 统计学处理 所有数据用均数均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2. 结果

2.1 丹参饮对胃溃疡大鼠溃疡指数的影响见表 1。给药 14d 后,丹参饮各剂量组的溃疡指数均较模型组有明显降低 ($P < 0.01$)。

表 1 丹参饮对胃溃疡大鼠溃疡指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	溃疡指数 / mm^2
正常组	—	—
模型组	—	7.88 ± 2.53
丹参饮	1.75	$3.92 \pm 1.81^{**}$
丹参饮	3.5	$3.05 \pm 0.67^{**}$
丹参饮	7	$2.04 \pm 0.94^{**}$

与模型组比较 $^{**}P < 0.01$

2.2 丹参饮对胃溃疡大鼠血清 NO、血浆 PGE_2 的影响 结果表明,溃疡形成后大鼠血清 NO 含量明显低于正常 ($P < 0.01$),但各治疗组的 NO 含量均较模型组有显著提高 ($P < 0.01$);模型组大鼠血浆 PGE_2 含量与正常组比较未见明显差异,在各治疗组中,丹参饮大、中剂量组可明显提高大鼠血浆中 PGE_2 含量 ($P < 0.05$),见表 2。

表2 丹参饮对胃溃疡大鼠血清 NO、血浆 PGE₂ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	NO 含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PGE ₂ 含量/pg · mL ⁻¹
正常组	—	42.98 ± 11.56	279.12 ± 85.74
模型组	—	16.17 ± 5.21 [△]	222.97 ± 61.43
丹参饮	1.75	33.21 ± 10.92**	250.65 ± 54.72
丹参饮	3.5	40.52 ± 11.03**	283.49 ± 40.68*
丹参饮	7	49.46 ± 13.84**	313.4 ± 78.7*

与正常组比较 [△]P<0.05; 与模型组比较, * P<0.05, **P<0.01

2.3 丹参饮对胃溃疡大鼠胃壁结合粘液含量的影响 运用计算机图像分析测量再生粘膜总面积中 PAS 阳性面积的百分数。结果胃粘膜表面上皮细胞分泌中性粘液而被染成红色, 故呈 PAS 阳性, 丹参饮组 PAS 阳性面积明显多于对照组 (P<0.01)。见表 3。

表3 丹参饮对乙酸性胃溃疡大鼠胃壁结合粘液含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	PAS 阳性面积 /%
正常组	—	8.53 ± 1.43
模型组	—	9.61 ± 2.02
丹参饮	1.75	14.16 ± 3.17**
丹参饮	3.5	15.34 ± 2.14**
丹参饮	7	18.94 ± 2.9**

与模型组比较: **P<0.01

2.4 丹参饮对胃溃疡大鼠溃疡边缘粘膜细胞凋亡和凋亡相关基因 Bcl-2 的影响。见表 4。正常大鼠胃粘膜, 凋亡细胞主要位于表面上皮内, 呈簇状分布或单个散在分布。TUNEL 阳性反应物质为棕黄色, 位于细胞核内, 浓缩的核质紧贴于核膜, 或核质呈现均匀的染色。乙酸诱发的大鼠胃溃疡模型中, 凋亡细胞数明显增多, 在粘膜全层均可见到, 呈弥漫性分布, 溃疡边缘粘膜细胞 AI 明显增加(P<0.01), 而丹参饮治疗组 AI 均明显下降, 其中 7、3.5 g · kg⁻¹ 剂量组与模型组比较有极显著差异 (P<0.01)。凋亡抑制基因 Bcl-2 蛋白主要在胃腺区呈中等阳性表达, 细胞浆呈棕黄染色。模型组 Bcl-2 的表达明显低于正常 (P<0.01), 而丹参饮各组较模型组均有所增加, 其中 7、3.5 g · kg⁻¹ 剂量组更为显著 (P<0.01), 但大剂量组仍略低于正常。

表4 丹参饮对胃溃疡大鼠溃疡边缘粘膜细胞凋亡和凋亡相关基因 Bcl-2 的影响 ($\bar{x} \pm s$) (n=8)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	AI /%	Bcl-2	
			平均光密度	面积百分比 /%
正常组	—	4.92 ± 1.26	1.49 ± 0.15	23.35 ± 3.22
模型组	—	10.85 ± 2.37 ^{△△}	0.84 ± 0.25 ^{△△}	13.45 ± 2.65 ^{△△}
丹参饮	1.75	8.27 ± 2.02*	0.96 ± 0.22	17.54 ± 2.94**
丹参饮	3.5	6.23 ± 1.59**	1.30 ± 0.31**	18.89 ± 2.56**
丹参饮	7	5.38 ± 1.23**	1.41 ± 0.27**	20.01 ± 2.48**

注: 与正常组比较 ^{△△}P<0.01, 与模型组比较*P<0.05, ** P<0.01。

2.5 丹参饮对胃溃疡大鼠溃疡边缘粘膜细胞 EGFR 表达的影响。见表 5。EGFR 在正常大鼠胃腺颈部、基底部均有弱阳性表达, 在胃溃疡大鼠的胃粘膜上皮细胞中表达有所增加 (P<0.05), 与模型组比较, 丹参饮 7、3.5 g · kg⁻¹ 剂量组 EGFR 的平均光密度值增加显著 (P<0.01), 各剂量组的面积百分