

J Chin Med 12(4), 251-266, 2001

兩側足三里穴注射黃耆、當歸混合液 對甲基硝基亞硝基胍誘發大鼠胃粘膜 組織損傷及胃粘液屏障的影響

孫茂峰^{1,2,3} 王茵萍⁴ 林昭庚³ 謝慶良^{1,2}

¹長庚紀念醫院中醫分院

²長庚大學中醫系

桃園

³中國醫藥學院中國醫學研究所

台中

⁴南京中醫藥大學第二臨床醫學院

南京

(2001年5月7日受理, 2001年11月13日收校訂稿, 2001年11月21日接受刊載)

兩側足三里穴注射黃耆和當歸混合液來治療慢性萎縮性胃炎 (chronic atrophic gastritis, 以下簡稱 CAG) 在臨床上已被認為有效, 而一般認為慢性萎縮性胃炎的發生與胃粘膜組織及胃粘液屏障的損傷有密切的關係。因此, 本研究更進一步探討了兩側足三里穴注射黃耆和當歸混合液對胃粘膜組織及胃壁屏障的影響。方法是將分別自由飲用甲基硝基亞硝基胍 (N-methyl-N-nitro-N-mitroso-guanidine, MNNG) 溶液 40 µg/ml 和 60 µg/ml 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 經九周和三十一周後將它們部份犧牲觀察胃粘膜損傷、萎縮、腸化 (metaplasia) 和異常增生的程度, 並於第十周到三十一周間施行注射黃耆和當歸混合液來與對照組做比較。根據胃粘膜損傷、萎縮、腸化生和異常增生的程度, 以及氨基己糖和磷脂濃度的變化當做指標來做為穴位注射的療效評估。結果發現胃粘膜損傷、萎縮、腸化生和異常增生的程度與服用 MNNG 溶液的濃度和時間呈現正的相關關係, 同時服用甲基硝基亞硝基胍溶液也能使氨基己糖和磷脂濃度下降, 但於兩側足三里穴施行注射黃耆和當歸混合液的大鼠, 這些現象較為輕微, 同時它們的氨基己糖和磷脂濃度也較高。

我們的結論是兩側足三里穴施行注射黃耆和當歸混合液可以減輕甲基硝基亞硝基胍溶液所誘發的胃粘膜損傷、萎縮、腸化和異常增生, 以及氨基己糖和磷脂的減少, 並且於兩側足三里穴施行注射黃耆和當歸混合液可以保護胃粘膜組織的損傷和胃粘液屏障, 因此可用來治療人類胃部有關粘膜損傷的疾病, 如慢性萎縮性胃炎等。

關鍵詞: 黃耆當歸混合液, 胃粘膜, 胃粘膜屏障, 足三里穴, 甲基硝基亞硝基胍。

聯絡人: 孫茂峰, 長庚紀念醫院中醫分院, 桃園縣龜山鄉復興街五號, 電話: (03)3281200 轉 3555, 3553。

前 言

胃粘膜及胃壁屏障的損傷已成為胃部疾病的熱門話題，如慢性萎縮性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是一種慢性病，它的主要病理特徵是胃粘膜腺體萎縮，粘膜變薄，粘膜肌增厚及伴腸上皮化生 (腸化或 IM)，異型增生 (異增或 ATP)，而且它常伴隨胃酸及胃蛋白 分泌減少¹。由於它的發病率高，病程緩慢，而且容易產生癌變，所以臨床上受到重視²。1978 年，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 將它列為胃癌前狀態³，中國大陸國家科學技術委員會暨國家中醫藥管理局於 1991 年更將胃癌前病變列為“中醫藥防治重大疾病研究的攸關課題之一⁴”。一般認為 CAG 的根本問題在於胃粘膜捍衛屏障的損傷導致一連串變化的結果⁵⁻⁶，然而近年來發現，從慢性萎縮性胃炎形成及進展至胃癌過程中，幽門螺旋桿菌 (helicobacter pylori, HP) 的感染因素成為研究的熱門話題。許多的研究已說明，幽門螺旋桿菌感染是導致慢性胃炎的主要病因，同時它也被認為是胃癌發生的危險因素之一⁷。然而，從幽門螺旋桿菌感染至慢性萎縮性胃炎然後到胃癌發生的階段需要經過一個長久的病程，而在這長久的病程中，各種致病因子或基因產物都在不同階段扮演著單獨或協同作用的角色⁸，因此，在這長久的病程中如何保護胃壁屏障的功能十分重要。

根據中醫學的理論，慢性萎縮性胃炎發展過程是屬於本虛標實，所以，治療應以扶正驅邪為主，而且選擇具有益氣健脾，活血通絡的藥物⁹。一些研究報告指出使用中醫的方法治療慢性萎縮性胃炎，對於臨床症狀的有效率介於 70~90% 之間，若使用胃鏡觀察則有效率 70% 左右，而病理的觀察則有效率達到 60~70%¹⁰。根據南京中醫藥大學的研究結果已知使用黃耆、當歸混合液於足三里穴位作穴位注射可產生抗幽門螺旋桿菌¹⁰、提高免疫功能¹¹、和抗自由基損傷¹²的作用。

因此本研究的目的是以甲基硝基亞硝基胍 (N-methyl-N-nitro N-nitrosoguanidine, MNNG) 造成大鼠胃粘膜及胃壁屏障損傷的模型，使用黃耆、當歸混合液於兩側足三里穴作穴位注射改善粘膜損傷與粘膜病變的效果進行分析，從胃粘膜損傷、粘膜病變與粘液屏障功能來探討。

材料與方法

一、模型的建立

(一)動物

選近交系 SD 大鼠 100 隻，雄性，出生 15 天。平均體重 110 ± 10.8 克，由南京中醫藥大學動物中心提供。

(二)實驗分組及過程

依據大鼠實驗性胃癌前病變甲基硝基亞硝基胍病理模型法¹³並加以改進，複製大鼠胃粘膜病模型。將大鼠正常飼養 3 天後，隨機分為控制組 (20 隻)、模型一組 (40 隻) 與模型二組 (40 隻)。模型一組自由飲用 40 $\mu\text{g/ml}$ 的甲基硝基亞硝基胍溶液；模型二組自由飲用 60 $\mu\text{g/ml}$ 的甲基硝基亞硝基胍溶液 (德國 Fluka 公司製造，購自上海化學試劑公司。先用等離子水配成 1 g/L 的母液，避光 4°C 保存，用前 2 小時以蒸餾水稀釋為 60 $\mu\text{g/ml}$ ，裝於外塗黑色油漆的飲水瓶中)，每日更換一次；控制組自由飲用蒸餾水。其中模型一組與模

型二組在造模滿 9 周，並經監測已證實見到部分萎縮、腸化時各隨機抽取 15 隻作為穴注一組及穴注二組的實驗材料。實驗各組均用標準飼料餵飼。

(三)監測

自第七周始，每隔 2 周分別斷頭處死造模組各 2 隻大鼠，取胃作石蠟切片後進行病理檢查，動態觀察造模情況，觀察內容主要包括胃粘膜萎縮、腸化生和異型增生的有無，出現的時間和程度。

二、穴位注射的方法

(一)穴位注射的時間

穴注一組與穴注二組在造模一組及造模二組分別自由飲用 40 $\mu\text{g/ml}$ 及 60 $\mu\text{g/ml}$ 的甲基硝基亞硝基胍溶液第 10 周起進行穴位注射治療，至第 31 周結束時停止，這期間繼續服用以上相同濃度甲基硝基亞硝基胍溶液；造模組只造模不施加任何治療；控制組不作任何處理，採用相同條件飼養。在第 9 周及第 31 周時各處死一批大鼠。

(二)選穴、定穴與取穴

選穴：選取大鼠足三里穴為穴位注射治療之穴位。定穴：依據江蘇省中醫藥研究所華興邦研究員等受中國針灸學術部的委託研究繪製而成的大鼠穴位圖譜。本研究所取足三里穴即華興邦教授等利用模擬骨度法研製的大鼠穴位圖譜中的足三里穴。取穴：研究開始時將大鼠左右後肢膝關節外下方，即腓骨小頭下方體毛除去，確定穴位（腓骨小頭下方 5 mm 處）後用苦味酸作標記。

穴注藥物：黃耆注射液（10 ml/支，每 10 ml 相當於生藥 20 g，成都地奧九泓制藥廠，批號：9709008）；當歸注射液（2 ml/支，每 2 ml 相當於生藥 100 mg，江蘇國營常熟制藥廠，批號：9701022）。

穴注劑量：穴注藥物劑量換算公式如下： $DB=DA\times RB(WA1/3\div WB1/3)/RA$ 。[注：DB 為欲求算的大鼠的每公斤體重用藥劑量。DA 為人的每公斤體重用藥劑量；WA、WB 為人和大鼠的體重；RA、RB 為人和大鼠的體型係數， $RA = 0.09$ ； $RA = 0.11$]

穴注方法：選用黃耆注射液與當歸注射液等分混合使用，劑量由人與動物之劑量換算公式得出，一般控制在每百克體重注射上述混合液 0.1 ml。器械：注射針頭選用 5 號針頭，注射器為 1 ml 皮試針筒。操作方法：穴位注射由兩人協作完成，助手將大鼠固定於特製的固定架上，並固定注射下肢，操作者定準大鼠後三里穴，刺入 0.3~0.5 cm，回抽無血，緩慢推入藥液。為隔日單側輪流注射。

三、胃粘膜組織和胃粘液屏障的觀察

(一)胃粘膜組織病理學觀察

1. 採用斷頭處死的方式，速取出鼠胃，沿胃大彎由幽門至賁門縱行剖開，攤開平展，以生理鹽水沖洗。
2. 將腺胃沿長軸由胃小彎、胃前壁各取胃粘膜一條，2 cm×0.3 cm。
3. 將胃粘膜平鋪於軟木板上，用大頭針固定，放入裝有 10% 甲醛溶液標本瓶中固定。
4. 固定後標本以流水沖洗 24 小時，梯度酒精逐級脫水呈透明狀後以石蠟包埋，貯於 4°C 冰箱備用。

5. 石臘標本切片厚度為 5 nm，作蘇木精 - 伊紅即常規 HE 染色。具體操作參見¹⁴，封片後置盒中。

6. 用 OLYMPUS-BX60 (日本) 光學顯微鏡下觀察切片。胃粘膜糜爛、胃粘膜萎縮、腸化、增生。萎縮、腸化、增生等病理學診斷由江蘇省中醫院病理科和南京醫科大學病理學系兩位高年資病理醫師盲法作出。其中：

(1) 胃粘膜糜爛

根據胃粘膜損傷深度的程度，將胃粘膜損傷程度分為輕、中、重、超重四個等級¹⁵：輕度：被覆上皮細胞淺表損害，損傷等級分：1 分；中度：粘膜小凹以上損害，表現為淺糜爛，損傷等級分：2 分；重度：粘膜小凹以下損害，表現為深糜爛，損傷等級分：3 分；超重：粘膜全層壞死脫屑，表現為急性潰瘍，損傷等級：4 分。將每組動物損傷等級評分累加並除以該組的動物數，即得該損傷組的胃粘膜深度損傷指數。

(2) 胃粘膜萎縮

胃粘膜萎縮診斷參照文獻¹⁶，按胃粘膜萎縮及粘膜肌增生的有無和程度，將胃粘膜萎縮分輕中重三級：萎縮 1/3 以內者為輕度，萎縮 1/3 ~ 2/3 者為中度，萎縮 2/3 以上者為重度。

(3) 胃粘膜腸化

胃粘膜腸化的診斷主要參照文獻¹⁷。觀察胃粘膜是否有腸化現象、腸化分佈及腸化程度。腸化分佈分為個別、灶性、瀰漫三級；腸化程度結合全國胃癌防治研究協作組病理組制定標準加以修正：將腸化生按其所占胃粘膜固有腺的比例多少分為輕度、中度及重度。輕度系指在腸化僅見胃粘膜腺頸部或者腸化腺管占固有膜比例小於 1/3，中度指腸化腺體占固有膜比例的 1/3 ~ 2/3，重度者指腸化腺體占固有膜比例大於 2/3，大部分腺管已發生腸化生，殘存的原有胃腺僅占少數。

(4) 胃粘膜增生

增生的病理診斷及分級標準參照《中國常見惡性腫瘤診治規範》的標準¹⁸。

(5) 粘液組化

穴二組和模二組備用切片行 AB (PH 2.5) PAS 和 HID/AB (PH 2.5) 兩種方法粘液組化染色¹⁹⁻²⁰。粘液組化染色切片由江蘇省中醫院病理科完成。其中 HID/AB (PH 2.5) 染色由江蘇省針灸學重點實驗室形態完成。其主要試劑由福建三強公司提供。

根據上述粘液組化染色結果，將腸化分為：完全性小腸型 (Ia)；完全性結腸型 (Ib)；不完全性小腸型 (IIa)；不完全性結腸型 (IIb)。

在統計中，同一樣本，如既有 I 型又有 II 型；則取其重者 II 型；如既有 a 型又有 b 型，取其重者 b 型。

(二) 胃粘液屏障觀察及方法

胃粘膜氨基己糖、磷脂的測定參照文獻²¹的方法進行。

用玻片刮取腺胃部壁部胃粘膜，精確稱重，將胃粘膜倒入勻漿器中，製成勻漿，加入生理鹽水，混勻，離心取上清液，低溫冰箱冷凍保存備檢。

1. 氨基己糖：以同樣上清液 0.8 ml 加濃 HCl 0.4 ml 置沸水浴中 30 分鐘，冷卻後加無水酒精 1.5 ml 和二甲苯甲醛 0.5 ml，37 度避光 1 小時後，用 530 nm 比色，結果以 ug/mg 上清液蛋白表示。
2. 磷脂：取上清液 1.0 ml 加甲醇/氯仿 3 ml 抽提，接著加氯仿 1.0 ml，再加水 1.0 ml 混均先用 2500 r/min 離心 5 分鐘，吸底層的液體置 70 度水浴箱蒸發氯仿，加 60% 高氯酸消化為無機磷，測定結果以 ug/mg 上清液蛋白表示。

測定所用紫外分光光度計：型號 754，上海第三分析儀器廠生產。

具體步驟

1 製備組織勻漿

氨基己糖的測定

上清液 0.8 ml，標準液 0.8 ml → 各加濃 HCl 0.4 ml → 沸水，水解 4 小時 → 水解結束，加一滴酚 指示劑 → 用 12N, 4N, 1N NaOH 調 PH 至弱鹼 → 用 1N HCl 回滴定，至弱酸-弱鹼之間 → 加蒸餾水至 1.5 ml → 加 4% 乙 丙酮液 0.5 ml，沸水浴 30 分鐘 → 冰水冷卻 5 分鐘，加水補充至 2.0 ml → 加無水乙醇 1.5 ml → 加對二甲苯甲醛 0.5 ml → 暗房 37 度顯色 45 分鐘 → 以空白管調“ O”， $\lambda = 530 \text{ nm}$ 比色，單位 ug/ml 上清液。

結果計算 = $R/S \times \text{標準液量} \times \text{標準液濃度} \times 1 / \text{上清液量} \times 1 / \text{上清液蛋白} = R/S \times 0.8 \times 30 \times 1 / 0.8 \times 1 / (1.45D_{280} - 0.74D_{260}) \times 15 = R/S \times 2 / 1.45D_{280} - 0.74D_{260}$

磷脂的測定

上清液 1.0 ml → 加甲醇 2.0 ml，抽提振蕩 → 加氯仿 1 ml 抽提振蕩 → 加 H₂O 1.0 ml，抽提振蕩 → 2500 轉 / 分，離心 5 ~ 10 分鐘，棄去上清液，吸取下層氯仿 → 60 ~ 80°C 水浴蒸發至幹 → 加高氯酸 0.2 ml，在電爐上消化，由黃完全變白 → 測定管加 H₂O 2.5 ml，標準管加標準液 0.1，H₂O 2.5 ml → 高氯酸 0.2 ml，空白管加 H₂O 2.5 ml，高氯酸 0.2 ml → 加 5% 鉬酸 0.25 ml → 加 1-氨基 2-萘酚 4 磺酸 0.1 ml → 37 度顯色 20 分鐘 → 以 B 調“ O”， $\lambda = 660 \text{ nm}$ 比色，單位 ug/ml。

結果 = $R/S \times \text{標準液量} \times \text{標準液濃度} \times 1 / \text{上清液量} \times 1 / \text{上清液蛋白} = R/S \times 0.04 \times 0.1 \times 1 / 1 \times 1 / (1.45D_{280} - 0.74D_{260}) \times 15 = R/S \times 0.004 \times (1.45D_{280} - 0.74D_{260} \times 15)$

(三) 胃粘膜超微病理觀察

1. 採用斷頭處死大鼠後，速取出鼠胃，於 1 ~ 2 分鐘內，在大鼠前胃得切取小塊組織，用鋒利刀片修成的 0.5 ~ 1 mm³ 有一定形狀的小塊立即投入盛有戊二醛的有蓋小瓶內。小瓶置於冰盒內。
2. 製作樣本時用磷酸緩衝液充分漂洗，1% 四氧化鉻後固定，固定溫度 0 ~ 4 度。
3. 梯度酒精逐級脫水，將需切片的一端正對膠囊底部用 Epon812 包埋，每個樣本包埋 5 個組織塊。
4. 為確定超薄切片的方向及選取需要的研究部位，在超薄切片機上先選取數張 0.5 ~ 2 um 厚的半薄切片，染色後進行初步觀察。
5. 超薄切片厚度 50 nm，檸檬酸鋁和醋酸鈾雙重染色，載於銅網上用 JEM-100CX 穿透式電子顯微鏡進行觀察。以上操作方法參見²²。

6. 觀察內容主要包括細胞及其內胞器 (organelle) 的結構。病理診斷由南京醫科大學資深電鏡教授盲法作出。

四、統計分析

選用 SAS 統計軟體 6.12 版 (Windows 版) 進行。計量資料行 mean ±SD 的 t 檢驗，進行組間兩兩均數比較，或對不同病變程度的均數行兩兩比較。計數資料 (個、隻) 行 χ^2 檢驗 (卡方檢定；chi-square)。根據列的屬性，分別行雙向無序或單向有序檢驗，部分資料行相關分析。

結 果

一、不同濃度甲基硝基亞硝基胍在處理後對胃粘膜損傷的影響 (見表 1)

從表 1 可見，兩模型組自 9 周開始即有不同程度的胃粘膜損傷，模一組前後比較，T 值為 2.45；模二組 T 值為 3.41，P 均 < 0.05；兩模型組間比較，9 周時 T 值為 1.87，P > 0.05，差異不明顯；31 周時，T 值為 2.78，P < 0.05；表明隨造模時間及濃度的增加，胃粘膜損傷程度明顯加重。

二、不同濃度甲基硝基亞硝基胍在處理後對胃粘膜萎縮、腸化及異型增生的影響 (見表 2)

由表 2 得知，對各組萎縮、腸化、異增的發生鼠數在不同時限作雙向無序 χ^2 檢驗，9 周時， $\chi^2 = 1.027$ ，P > 0.05，31 周時， $\chi^2 = 6.128$ ，P < 0.05，說明隨著造模時間及濃度的增加，其萎縮、腸化、異增或兩病合見者明顯增加，粘膜病變在加重。

三、不同濃度甲基硝基亞硝基胍處理後對胃粘膜氨基己糖與磷脂值的影響 (見表 3)

由表 3 得知，模型組氨基己糖值在不同時限與控制組比較，9 周時 T 值分別為 3.324 及 4.321，P 均 < 0.05，

表 1 三組不同時限粘膜損傷指數比較

組別	鼠數	黏膜深度損傷指數	
		9 周	31 周
1 控制組	20	0	0 ±0
2 模一組	25	1.60**	1.92 ±0.32**
3 模二組	25	1.80**##	2.23 ±0.34**##

* : P < 0.05，** : P < 0.01，值與 1 相比較。

: P < 0.05，## : P < 0.01，值與 2 相比較。

表 2 三組不同時限粘膜病變情況比較

組別	鼠數	萎縮		腸化		異型增生	
		9 周	31 周	9 周	31 周	9 周	31 周

1 控制組	20	0	0	0	2	0	0
2 模一組	25	4	14	1	7	0	3
3 模二組	25	6	7	3	15	0	7

表 3 三組不同時限胃粘膜氨基己糖、磷脂的比較

組別	鼠數	氨基己糖		磷脂	
		9 周	31 周	9 周	31 周
1 空白組	20	61.21 ±3.21	59.44 ±5.41	6.95 ±2.51	6.56 ±0.32
2 模一組	25	55.27 ±2.15*	44.72 ±3.91**	5.12 ±0.24**	3.75 ±0.21**
3 模二組	25	53.29 ±3.33*	37.29 ±4.53***	4.78 ±0.25	2.88 ±0.19***

* : P < 0.05 , ** : P < 0.01 , 值與 1 相比較。

: P < 0.05 , ## : P < 0.01 , 值與 2 相比較。

表 4 各組胃粘膜損傷指數比較

組別	鼠數	黏膜深度損傷指數
1 控制組	10	0 ±0
2 模一組	15	1.92 ±0.32
3 模二組	15	2.23 ±0.34#
4 穴注一組	15	1.56 ±0.25 ##
5 穴注二組	15	1.81 ±0.34@@

: P < 0.05 , ## : P < 0.01 , 值與 2 相比較。

@ : P < 0.05 , @@ : P < 0.01 , 值與 3 相比較。

有顯著差異；但兩模型組間比較，T 值為 1.898，P > 0.05。31 周時模型組與對照組相比，T 值分別為 7.914 及 11.088，P 均 < 0.001，有高度顯著差異；兩模型組間比較，T 值為 4.089，P < 0.001，顯示甲基硝基亞硝基胍溶液可造成胃粘液氨基己糖值明顯下降。再按不同時限將各組作前後比較：對照組 T 值為 0.927，P > 0.05；模一組 T 值為 7.751，模二組 T 值為 9.553，P 均 < 0.001，顯示隨造模濃度增加，氨基己糖值顯著減少。

模型組磷脂值在不同時限與正常組比較，9 周時 T 值分別為 12.117 及 12.081，P 均 < 0.05，有顯著差異；但兩模型組間比較，T 值為 3.012，P > 0.05。31 周時模型組與對照組相比，T 值分別為 28.434 及 38.297，P 均 < 0.001；兩模型組間比較，T 值為 11.898，P < 0.01，同樣顯示甲基硝基亞硝基胍溶液可造成胃粘液磷脂值明顯下降。再按不同時限將各組作前後比較：對照組 T 值為 2.538，P < 0.05；模一組 T 值為 15.101，模二組 T 值為 21.598，P 均 < 0.001，顯示隨造模濃度下降，磷脂值亦明顯減少。

四、穴位注射對胃粘膜損傷的影響 (見表 4)

由表 4 得知，穴注一組與模一組及穴注二組與模二組之比，T 值分別為 3.433，3.382，P 均 < 0.01，表明穴注組可明顯改善胃粘膜損傷指數。

五、穴位注射對胃粘膜萎縮、腸化、異型增生的影響 (見表 5)

由表 5 得知，將各組萎縮、腸化、異增的發生鼠數作雙向無序 χ^2 檢驗，相應穴注組與模型組之 χ^2 值分別為 2.134、6.645， $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ ，表明穴注法對大鼠實驗性慢性萎縮性胃炎胃部相關病變有較好的防治作用。

表 5 各組胃粘膜病變比較

組別	鼠數	萎縮	腸化	異增
1 控制組	10	0	2	0
2 模一組	15	14	7	3
3 模二組	15	7	15	7
4 穴注一組	15	7	2	0
5 穴注二組	15	9	3	2

表 6 各組胃粘膜萎縮程度比較

組別	鼠數	正常	輕度萎縮	中度萎縮	重度萎縮
1 控制組	10	10	0	0	0
2 模型一組	15	1	6	5	3
3 模型二組	15	8	2	2	3
4 穴注一組	15	8	3	3	1
5 穴注二組	15	6	5	3	1

表 7 各組腸化發生率比較

組別	鼠數	腸化生有	腸化生無
1 控制組	15	2	13
2 模型一組	15	7**	8**
3 模型二組	15	15**	0#
4 穴治一組	15	2###	13##
5 穴治二組	15	3@@@	12@@@

* : $P < 0.05$ ，** : $P < 0.01$ ，值與 1 相比較。

: $P < 0.05$ ，## : $P < 0.01$ ，值與 2 相比較。

@ : $P < 0.05$ ，@@ : $P < 0.01$ ，值與 3 相比較。

六、穴位注射對胃粘膜萎縮程度的影響 (見表 6)

由表 6 得知，以 χ^2 檢驗， $\chi^2 = 9.519$ ， $P < 0.05$ 。提示胃粘膜萎縮程度與實驗分組有關。結合表中資料可以認為，穴注法可以減少中重度胃粘膜萎縮的發病數，減輕胃粘膜萎縮程度。

七、穴位注射對腸化發生率的影響 (見表 7)

從表 7 得知，各組腸化發生率經 χ^2 檢驗， $\chi^2 = 61.07$ ($P < 0.001$)；表明腸化發生與分組有關。結合表中資料，說明穴位注射能夠顯著逆轉腸化。

八、穴位注射對腸化程度及腸化分佈的影響 (見表 8)

從表 8 得知，各組腸化分佈資料經 χ^2 檢驗， $\chi^2 = 8.47$ ， $P < 0.001$ ；表明腸化分佈與分組有關。結合表中資料，說明穴位注射有效改善了腸化的病理分佈特徵，即可減輕腸化程度。

各組腸化程度資料經 χ^2 檢驗， $\chi^2 = 10.25$ ， $P < 0.001$ 。表明腸化程度與分組有關。結合表中資料，說明穴位注射可減輕腸化的程度。

表 8 各組腸化程度及腸化分佈比較 (隻)

組別	鼠數	腸化分佈				腸化程度			
		正常	個別	灶性	彌漫	正常	輕	中	重
1 空白組	15	13	2	0	0	13	2	0	0
2 模一組	15	8	1	4	2	8	5	1	1
3 模二組	15	0	0	1	14	0	0	3	12
4 穴一組	15	13	0	1	1	13	0	1	1
5 穴二組	15	12	0	1	2	12	1	1	1

表 9 各組腸化亞型比較

組別	鼠數	Ia	Ib	IIa	IIb
1 控制組	10	2	0	0	0
2 模二組	15	0	2	4	9
3 穴二組	15	1	4	3	2

表 10 各組異型增生分級比較 (隻)

組別	鼠數	增生分級			
		正常	輕	中	重
1 空白組	15	15	0	0	0
2 模一組	15	12	2	1	0
3 模二組	15	8	1	3	3
4 穴一組	15	15	0	0	0
5 穴二組	15	13	1	1	0

九、穴位注射對腸化亞型的影響 (見表 9)

從表 9 得知，根據粘液組化染色結果，將腸化分為 4 種亞型。對表中 Ia、Ib、IIa、IIb 腸化發生例數行單向有序 χ^2 檢驗， $\chi^2 = 4.47$ ， $P < 0.01$ 。表示上述兩種腸化亞型分型與分組有關。結合表中資料，提示穴位注射可減輕腸化向癌變危險程度相對較高的腸化亞型分佈。說明穴位注射可減少癌變危險程度相對較高的腸化亞型的發生率，對 IIb 型腸化具有較好的防治作用。

十、穴位注射對異型增生分級的影響 (見表 10)

從表 10 得知，以資料行單向有序 χ^2 檢驗， $\chi^2 = 1.52$ ， $P > 0.05$ 。此統計表明，各組異增程度分級的病例與分組有關。根據表中資料，說明穴位注射可減少癌變危險程度相對較高的異增的發病數，減輕異增程度。

十一、穴位注射對異型增生發生部位的影響 (見表 11)

從表 11 得知，每組異增病例不多，故對異增病變部位數作統計。但對表 29 中資料行 χ^2 檢驗， $\chi^2 = 47.81$ ， $P < 0.01$ 。此統計表明，各組胃粘膜異增部位與分組關係不大。即穴位注射對異增部位影響不大。

表 11 各組異型增生發生部位比較 (隻)

組別	鼠數	部位數	表面型	中間型	深在型
1 控制組	15	0	0	0	0
2 模一組	15	47	16	4	27
3 模二組	15	13	3	2	8
4 穴一組	15	10	2	2	6
5 穴二組	15	21	7	2	12

表 12 各組氨基己糖與磷脂比較

組別	鼠數	氨基己糖	磷脂
1 控制組	10	59.44±5.41	6.56±0.32
2 模一組	15	44.72±3.91**	3.75±0.21**
3 模二組	15	37.29±4.53**##	2.88±0.19**##
4 穴一組	15	54.87±3.64**##	5.68±0.34**##
5 穴二組	15	50.6±3.64**@@	4.92±0.27**@@

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, 值與 1 相比較。

: $P < 0.05$, ## : $P < 0.01$, 值與 2 相比較。

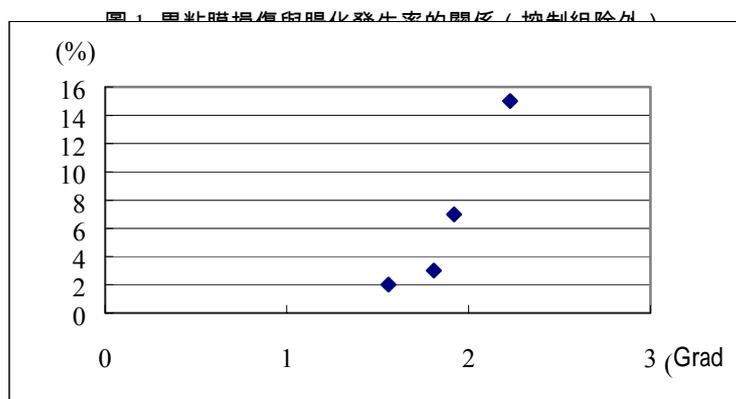
@ : $P < 0.05$, @@ : $P < 0.01$, 值與 3 相比較。

十二、穴位注射對胃粘膜氨基己糖與磷脂的影響 (見表 12)

從表 12 得知大鼠服用甲基硝基亞硝基胍後它們胃中粘膜的氨基己糖及磷脂濃度降低，但於兩側足三里穴注射黃耆、當歸混合液可以減少這些物質濃度的降低。

十三、各組胃粘膜損傷與腸化的相關性分析 (見圖 1)

由圖 1 對各組胃粘膜損傷指數與腸化發生率作相關性分析，相關係數為 $r = 0.951$ ， $P < 0.01$ 。表明隨著胃粘膜損傷程度的升高，腸化發生率也升高。提示防治胃粘膜損傷可降低胃粘膜腸化發生率。



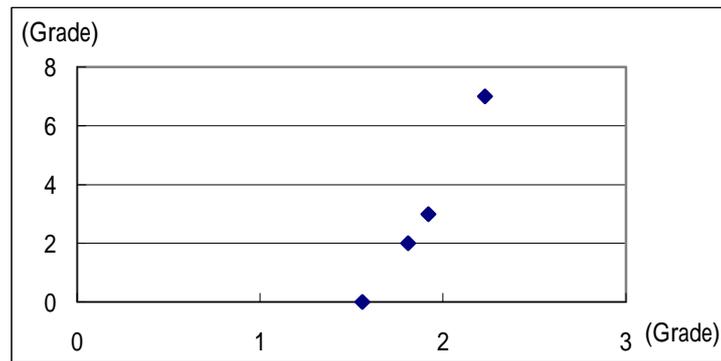


圖 2 胃粘膜損傷與異增發生率的關係

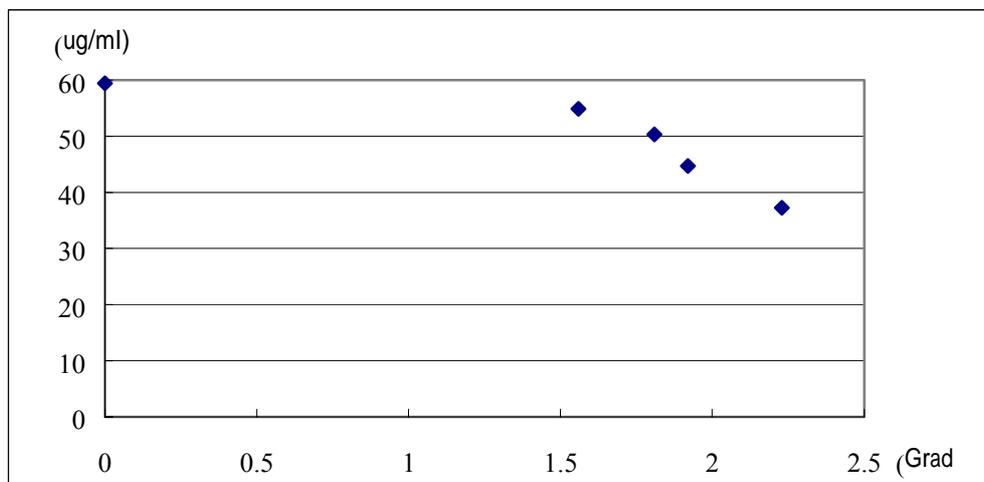


圖 3 各組胃粘膜損傷與氨基己糖的關係

十四、各組胃粘膜損傷與異型增生的相關性分析 (見圖 2)

由圖 2 得知，各組胃粘膜損傷指數與異增發生率作相關性分析，相關係數為 $r = 0.991$ ， $P < 0.01$ 。表明隨著胃粘膜損傷程度的升高，異增發生率也升高。提示防治胃粘膜損傷可降低胃粘膜異增發生率。

十五、各組胃粘膜損傷指數與氨基己糖值的相關性分析 (見圖 3)

由圖 3 得知，對各組胃粘膜損傷指數與氨基己糖作 Pearson 相關分析，相關係數為 -0.988 ($P < 0.01$)，表明胃粘膜損傷指數與氨基己糖值呈負相關。即隨著粘膜損傷程度的升高，氨基己糖值明顯下降，而當粘膜損傷程度減輕時，氨基己糖值則顯著上升。

十六、各組胃粘膜損傷指數與磷脂值的相關性分析 (見圖 4)

由圖 4 得知，各組胃粘膜損傷指數與磷脂值作 Pearson 相關分析，相關係數為 -0.972 ($P < 0.01$)，表明胃粘膜損傷指數與磷脂值同樣呈負相關。

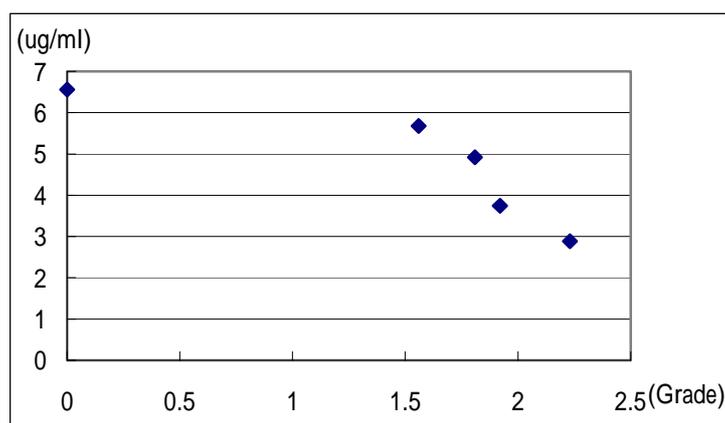


圖 4 各組胃粘損傷與磷脂的關係

十七、穴位注射對胃粘超微結構的影響

對模一組及模二組的電子顯微鏡觀察表明，從造模 9 周起，細胞呈現不同程度的病理改變。細胞游離面微絨毛稀疏變短，粒線體脊扭曲、排列紊亂，斷裂模糊；31 周時，細胞游離面微絨毛脫落，細胞間隙增寬，細胞連接減少；粒線體腫脹，脊模糊，基質變濃，粒線體膜部分溶解；內質網中重度擴張，呈環狀排列；高基氏體萎縮變小，失去其典型結構；細胞核增大或縮小，異染色質異常凝聚，核周間隙寬。而穴位治療組則能明顯改善以上細胞受損情況。

討 論

我們的結果顯示老鼠服用甲基硝基亞硝基胍溶液 40 $\mu\text{g/ml}$ 和 60 $\mu\text{g/ml}$ 後九周，它們的胃粘膜發生損傷，而這種損傷在濃度上服用 60 $\mu\text{g/ml}$ 比服用 40 $\mu\text{g/ml}$ 更嚴重，而且服用時間越長其損傷程度有較嚴重的趨勢。又隨著服用甲基硝基亞硝基胍濃度和時間的增加，胃粘膜萎縮、腸化和異常增生的發生率亦增加。

另外，胃粘膜的氨基己糖和磷脂的含量隨著服用甲基硝基亞硝基胍濃度的增加和時間的加長，它們的含量隨著減少。這些結果和先前的研究發現老鼠長期甲基硝基亞硝基胍可以導致胃癌，但它的癌前變化包括胃粘膜的損傷、萎縮、腸化生及異常的增生相似^{13,23,24}。磷脂在胃粘膜屏障中扮演著一個重要的角色，它可以阻礙胃腔內 H^+ 逆彌散而保護胃粘膜的損傷²⁵。胃酸是胃粘膜最強的攻擊因子，當胃內 H^+ 濃度增加時胃的酸鹼度降低很容易造成胃粘膜的損傷而造成潰瘍²⁶。先前的一些研究已知胃粘膜損傷的程度、胃粘膜腸上皮化生、胃粘膜上皮不典型的增生，以及慢性萎縮性胃炎和胃癌的發生有著密切的關係^{15,20,25,27-30}。另外，研究已發現 MNNG 能導致胃癌的發生與 c-Ha-rass 基因的突變和 c-met 基因的重排有關³¹。

我們的結果顯示在老鼠兩側足三里穴注射黃耆當歸混合液，可以減少甲基硝基亞硝基胍溶液所造成的胃粘膜的損傷、胃粘膜的萎縮、胃粘膜的腸化生和異常增生，以及增加氨基己糖和磷脂的濃度，這些結果說明足三里穴注射黃耆當歸混合液具有保護胃粘膜的作用，也就是加強胃壁屏障。根據研究指出電針狗的足三里

穴可以使胃粘膜的血流，針刺足三里穴對於實驗酒精性的胃粘膜損傷具有保護的作用，一般認為針刺足三里穴的這些作用與 NO 有關³²⁻³⁵。又電針足三里穴可使腦和胃中的 NOS 減少，同時減少應激性胃潰瘍，因此推測電針的這種對胃的保護作用可能經由中樞和腸神經系統來共同達成，而 NOS 也參與其中³⁶。針刺上脘、中脘、下脘、合谷和足三里穴能使慢性胃炎患者的胃泌素降低，所以推測針刺可以調節胃泌素而達到治療目的³⁷，又針刺兩側的足三里穴也可以經由植物性神經傳遞物質的抑制釋放達到保護胃粘膜的目的³⁸。先前的研究發現在慢性萎縮性胃炎患者兩側的足三里穴、肝俞和胃俞注射黃耆當歸混合液能使血清中的超氧自由基降低，同時超氧化物歧化酶 (SOD) 的濃度增加¹²，同時也改善胃黏膜的腸化現象³⁹，以及改善胃的化生功能⁴⁰。

另外，黃耆當歸混合液於兩側的足三里穴注射也可改善實驗性甲基硝基亞硝基胍誘發大鼠萎縮性胃炎的粘膜損傷⁴¹，因此我們可知道於兩側足三里穴注射黃耆、當歸混合液能改善甲基硝基亞硝基胍所誘發的胃粘膜及胃壁屏障的損傷，它的作用路徑是多重的，可能包含對 NO、胃泌素、自由基、胃粘膜的血流參與其中。

參考資料

1. 徐克成，慢性萎縮性胃炎的治療，南京：江蘇科技出版社，p.115，1993。
2. 王蘭英，慢性萎縮性胃炎證治研究進展，甘肅中醫 8：43-48，1995。
3. 危北海，慢性萎縮性胃炎的臨床研究，陝西中醫 8：289-298，1987。
4. 黃宏昌，關於慢性萎縮性胃炎中醫藥研究若干問題的探討，中國中西醫結合雜誌 12：558，1992。
5. 李瑜元，慢性胃炎，新醫學 29：230-232，1998。
6. 蕭樹東、朱舜時、江紹基等，慢性胃炎的胃粘膜屏障，中華內科雜誌 22：268-271，1983。
7. 蕭樹東、劉文忠，幽門螺桿菌感染與胃粘膜上皮細胞增殖和凋亡，中華內科雜誌 36：219-220，1997。
8. 謝勇，幽門螺桿菌與胃癌的關係，實用癌症雜誌 13：238-239，1998。
9. 甘淳、葛來安、黃海彬等，中醫藥診治慢性萎縮性胃炎研究進展及展望，中國中西醫脾胃雜誌 4：189-191，1996。
10. 張彩玲，慢性萎縮性胃炎中醫治療進展，江西中醫藥 28：55，1997。
11. 陳德成、吳旭，穴位注射對慢性萎縮性胃炎患者免疫調節作用機理研究，中國針灸 18：69-71，1998。
12. 陳德成、吳旭，穴位注射對慢性萎縮性胃炎患者血清 O₂ 和 SOD 的影響，中國針灸 18：263-264，1998。
13. 李春啟、劉為紋、房殿春，實驗動物胃粘膜癌前病的模型建立、發生機理及其逆轉治療的研究，第三軍醫大學學報 16：5-9，1994。
14. 杜卓民，實用組織學技術，北京：人民衛生出版，pp. 3-90，1982。
15. 宋伯根、李義清、趙桂芬等，胃粘膜損傷程度與胃癌發生的關係，癌症 12：372-374，1993。
16. 劉彤華主編，診斷病理學（第一版），北京：人民衛生出版社，pp. 62-65，1994。
17. 全國胃癌防治研究協作組病理組，胃十二指腸粘膜活檢，遼寧人民出版社，1981。
18. 全國腫瘤防治辦公室、中國抗癌協會，中國常見惡性腫瘤診治規範（第一版），北京：北京醫科大學學報、中國協和醫科大學聯合出版社，p.60，1990。

19. 于穎彥、張偉、岡田茂，實用免疫組織化學技術與圖譜，上海：上海科學普及出版社，pp.1-16，1996。
20. 房殿春、劉為紋，胃粘膜腸化生的分型及其與胃癌發生的關係，第三軍醫大學學報 12：169-172，1990。
21. 徐肇敏、張志宏、陳戴融等，幽門螺桿菌破壞胃粘膜屏障的研究，中華內科雜誌 34：603-605，1995。
22. 杭震鏞、蔡文琴，電子顯微鏡在臨床醫學中的應用（第一版），重慶：重慶出版社，1988。
23. 孟振行、雷道年，MNNG 誘發動物實驗性腺胃癌機理的研究進展，國外醫學· 消化系疾病分冊 17：136-139，1997。
24. 朱正綱、燕敏、尹浩然等，甲硝基亞硝胍誘發大鼠胃癌的實驗研究，上海第二醫科大學學報 12：121-124，1992。
25. 馬述春、李石、李少華等，磷脂在胃粘液屏障中作用的實驗研究，第二軍醫大學學報 17：370-373，1996。
26. 楊紅、孫潔，氫離子返流和胃粘膜局部缺血在應激性潰瘍發生機制中的作用，生理科學進展 18：260-262，1987。
27. 朱陽春、李茂生、耿昌友等，慢性萎縮性胃炎、胃粘膜上皮不典型增生與胃癌的相關性研究，中華消化內鏡雜誌 15：145-146，1998。
28. 姁健敏、王開明、黃懷德等，胃粘膜腸上皮化生的意義探討（摘要），浙江醫學 18：25-26，1996。
29. 張蔭昌、白雅珍、張文範，胃粘膜上皮不典型增生的病理及其演變的追蹤觀察，中華腫瘤雜誌 1：23-28，1979。
30. 孫貴銀，胃粘膜腸上皮化生及其與胃癌的關係，國外醫學· 消化系疾病分冊 17：133-136，1997。
31. 王冰、蘇秀蘭、寧濤等，MNNG 誘導人胃粘膜上皮細胞系 GES-1 及正常胃粘膜標本原癌基因的激活，中華腫瘤雜誌 18：6-9，1996。
32. 朱舜麗、許冠蓀、陳全珠等，艾灸和針刺對實驗性胃潰瘍大鼠 NO 含量的變化及 L-NNA 抑制作用的影響，針刺研究 22：177-179，1997。
33. 孫大勇、黃裕新、褚自宏等，電針對狗胃粘膜血流量的影響及與血漿胃腸激素的關係，華人消化雜誌 6：936-938，1998。
34. 王月芳、劉元亮、陳華德等，一氧化氮參與艾灸對大鼠急性胃粘膜損傷的保護作用，針刺研究（2）：140-144，1998。
35. 裴文芬、許冠蓀、孫勇等，針灸對胃粘膜損傷的保護作用及其與 NO 的關係，安徽中醫學院學報 16：44-47，1997。
36. 朱舜麗、許冠蓀、孫勇等，電針抗應激性胃潰瘍大鼠腦組織和胃粘膜中一氧化氮含量的變化，中國中西醫結合脾胃雜誌 5：217-219，1997。
37. 韓根言、孫輝，針刺對慢性胃炎患者胃泌素的影響，上海針灸雜誌 15：9-10，1996。
38. 潘朝龍、金文秀、沈德凱，針刺對大鼠胃粘膜保護作用及其相關的神經遞質組化的觀察，針刺研究 14：48-53，1990。
39. 陳德成、吳旭、朱雲華等，穴位注射對慢性萎縮性胃炎患者腸化亞型的影響，中國針灸 18：653-654，1998。
40. 錢忠順、趙玉美、姚文龍等，藥物穴位注射治療慢性萎縮性胃炎的療效觀察和實驗研究，中國針灸 8：1-3，

1988。

41. 陸斌、王維祥、陳德成等，穴位注射防治大鼠實驗性萎縮性胃炎的研究，中國針灸 18：182-184，1998。

J Chin Med 12(4): 251-266, 2001

THE EFFECT OF HUANG-QI AND DONG-KWA MIXTURE SOLUTION ON N-METHYL-N-NITRO-N-MITROSO-QUANIDINE INDUCED DAMAGE OF GASTRIC MUCOUS MEMBRANE AND GASTRIC MUCOUS BARRIER IN SD RATS: A STUDY USING BILATERAL ZUSANLI ACUPOINTS (ST-36)

Mao-Feng Sun^{1,2,3}, Yin-Ping Wang⁴, Jaung-Geng Lin³ and Ching-Liang Hsieh^{1,2}

¹*Institute of Chinese Medical Science, China Medical College,
Taichung, Taiwan*

²*Chang Gung Traditional Chinese Medicine Hospital,
Taoyuan, Taiwan*

³*Chang Gung University School of Traditional Chinese Medicine,
Taoyuan, Taiwan*

⁴*Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, the Second College of Clinical Medicine,
Nanjing, China*

(Received 7th May 2001, revised MS received 13th November 2001, accepted 21th November 2001)

The injection of Huang-Qi (黃耆) and Dong-Kwa (當歸) mixture solution at bilateral Zusanli acupoints (ST-36) has been used to treat chronic atrophic gastritis (CAG). Several studies found that the generation of CAG has closely related to damage of gastric mucous membrane and gastric mucous barrier, therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of Huang-Qi and Dong-Kwa mixture solution that was injected into bilateral Zusanli acupoints on gastric mucous membrane and gastric mucous barrier. The animal model in the Sprague-Dawley (SD) rats was established by oral administration of N-methyl-N-nitro-N-mitroso-quanidine (MNNG) 40 µg/ml or 60 µg/ml, respectively. The rats were sacrificed and pathological changes of gastric mucous membrane were observed including erosion, atrophy, metaplasia and hyperplasia 9 weeks or 31 weeks after MNNG administration. In addition, Huang-Qi and Dong-Kwa mixture solution was injected into bilateral Zusanli acupoints since 10th to 31th week. Effect of Huang-Qi and Dong-Kwa mixture solution was evaluated by changes of erosion, atrophy, metaplasia and hyperplasia in the gastric mucous membrane, and the levels of hexosamine and

phospholipid. The results indicated that gastric mucous membrane developed to erosion, atrophy, metaplasia and hyperplasia, and the levels of both hexosamine and phospholipid decreased after administration of MNNG. The degree of these changes had a positive correlation to the concentration and duration of MNNG administration. In addition, these changes were milder in the group of MNNG administration than in the control group without MNNG administration.

In conclusion, Huang-Qi and Dong-Kwa mixture solution injected into the bilateral Zusanli acupoints may decrease the damage of gastric mucous membrane including erosion, atrophy, metaplasia and hyperplasia, and may prevent the decrease of hexosamine and phospholipid levels in the MNNG-treated rats, suggesting Huang-Qi and Dong-Kwa mixture solution injected into the bilateral Zusanli acupoints may produce a protective action to gastric mucous membrane and gastric mucous barrier, therefore, it may be used to treat gastric diseases that result from the damage of gastric mucous membrane, such as CAG.

Key words : Huang-Qi and Dong-Kwa Solution, Gastric Mucosa, Gastric Mucous Barrier, Zusanli Acupoints, N-Methyl-N-Nitro-N-Mitroso-Quanidine (MNNG).

Correspondence to: Mao-Feng Sun, Chang Gung Traditional Chinese Medicine Hospital, No.5 Fu-Hsing St. Kweishan, Taoyuan, Taiwan. TEL: (03) 3281200 ext. 3555, 3553.