

不同姜汁制黄连抑制胃黏膜损伤方面的机制分析

王婷婷, 钟凌云*

(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**探讨生姜汁和干姜汁炮制黄连对乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用差异及其作用机制。**方法:**将大鼠随机分为7组,即空白组、模型组、生姜汁组、干姜汁组、生黄连组、生姜制黄连组、干姜制黄连组。采用乙醇致大鼠胃黏膜损伤,观察不同组大鼠胃黏膜损伤程度并计算胃黏膜损伤指数,取胃组织制成病理切片,光镜下观察大鼠胃黏膜组织学改变,采用酶联免疫吸附测定法测定血浆中白细胞介素-8(IL-8),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)的含量。**结果:**与模型组比较,生姜汁组、干姜汁组、生黄连组、生姜制黄连组、干姜制黄连组大鼠胃黏膜损伤指数均显著下降($P < 0.01$)。与生黄连组比较,生姜制黄连组和干姜制黄连组大鼠胃黏膜损伤指数明显降低($P < 0.05$),且生姜制黄连组损伤指数较干姜制黄连组更低。血浆中IL-8和TNF- α 的含量模型组与空白组相比显著上升($P < 0.05$),6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的含量则显著下降($P < 0.05$),给药后IL-8和TNF- α 含量均下降,6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的含量则有所上升,且姜制后作用更强。**结论:**黄连经过姜汁炮制后可增强其保护胃黏膜损伤的作用,作用机制可能是与抑制IL-8,TNF- α 的产生和促进6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的产生有关,生姜汁的炮制效果较干姜汁好。

[关键词] 黄连;姜黄连;生姜;干姜;胃黏膜损伤;白细胞介素-8;6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$

[中图分类号] R283.1;R285.5;R284.2;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0018-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120018

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1418.036.html>

[网络出版时间] 2017-03-24 14:18

Analysis of Mechanism of Coptidis Rhizoma Processed with Different Ginger Juice in Inhibiting Gastric Mucosal Injury

WANG Ting-ting, ZHONG Ling-yun*

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the differences of inhibition on gastric mucosal injury induced by ethanol in rats between Coptidis Rhizoma (CR) processed with different ginger juice and analyze its mechanism. **Method:** Rats were randomly divided into the normal group, model group, raw CR group, CR processed by fresh ginger juice (CRFG) group, CR processed by dried ginger juice (CRDG) group, fresh ginger juice (FG) group and dried ginger juice (DG) group. Gastric mucosal injury was induced by alcohol in rats except the normal group. The gastric mucosal injury index was calculated according to the literature scoring method. Histomorphologic changes in gastric mucosa were observed by light microscope. The levels of interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$) in plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Result:** Compared with the model group, the gastric mucosal injury indexes of FG group, DG group, CR group, CRFG group and CRDG group were decreased significantly. Compared with the CR group, the gastric mucosal injury indexes of CRFG group and CRDG group were decreased significantly, and the injury index of CRFG group was lower than that of CRDG group. The levels of IL-8 and TNF- α in plasma

[收稿日期] 20161229(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260643,81460605)

[第一作者] 王婷婷,在读硕士,从事中药炮制工艺及其机制研究,Tel:13672213861,E-mail:1102307906@qq.com

[通讯作者] *钟凌云,博士,教授,从事中药炮制研究,Tel:0791-87118939,E-mail:ly1638163@163.com

were significantly increased and 6-keto-PGF_{1α} was significantly decreased in the model group by comparing with the blank group. After administration of drugs, the levels of IL-8 and TNF-α were decreased and the contents of 6-keto-PGF_{1α} were increased, this effect became stronger after the CR processed with ginger juice. **Conclusion:** CR processed by ginger juice can enhance the protection of gastric mucosal injury, its mechanism may be through inhibition of production of IL-8 and TNF-α and promotion of production of 6-keto-PGF_{1α}, and FG is better than DG.

[Key words] Coptidis Rhizoma; Coptidis Rhizoma processed by ginger juice; Zingiberis Rhizoma Recens; Zingiberis Rhizoma; gastric mucosal injury; interleukin-8; 6-keto-prostaglandin F_{1α}

黄连性寒,味苦,具有清热燥湿、泻火解毒的功效^[1]。近年研究发现黄连具有独特的抗消化性溃疡作用,可开发成治疗消化性溃疡和慢性胃炎的良药^[2]。黄连苦寒较甚,临床上一般使用其炮制品,其中姜黄连为常用的炮制品之一。传统中医药理论认为,黄连姜制之后缓寒,增强了清胃和胃止呕作用。现代药理研究也表明黄连姜制之后具有更好的保护胃黏膜作用,但作用机制仍不明确^[3]。姜炙法中的姜汁主要由生姜榨汁或干姜煮汁而得,但生姜与干姜在化学成分和功效上存在较大差异,应区别使用^[4-5],目前对采用生姜汁和干姜汁炮制的区别研究仍较少^[6]。

本课题组前期已对生姜汁和干姜汁炮制对黄连寒热药性的影响进行了研究,初步证实黄连姜制后寒性得到缓和,且采用干姜汁炮制黄连缓寒作用更强。为了进一步研究不同姜汁制黄连对黄连药效的影响,本实验采用不同姜汁炮制黄连,比较其对乙醇致胃黏膜伤的差异,并测定血浆中白细胞介素-8,肿瘤坏死因子-α和6-酮-前列腺素 F_{1α}的含量,从炎症反应的角度探究其作用机制,为阐明姜黄连的炮制机制以及合理使用不同姜汁炮制黄连提供参考。

1 材料

BSA124S型1/1万电子天平和D-16C型台式低温高速冷冻离心机(德国赛多利斯公司),TKY-BMB型石蜡包埋机(湖北泰康医疗设备有限公司),RM2245型轮转切片机(上海徕卡显微系统贸易有限公司),Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo公司)。

黄连药材购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,产地四川,经江西中医药大学中药鉴定教研室葛菲教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎;白细胞介素-8(IL-8)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和6-酮-前列腺素 F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公

司),乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司),苏木精-伊红(HE)染液(南京建成科技有限公司)。

SPF级SD雄性大鼠,体重180~220g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,合格证号SCXK(鲁)2014-0007,经江西中医药大学实验动物伦理委员会的规定进行操作。

2 方法与结果

2.1 姜汁的制备^[6-7]

2.1.1 生姜汁 取新鲜的生姜100g,洗净切片,用榨汁机榨汁,过滤,滤渣加适量水,反复压榨成姜汁100mL,得生姜汁生药质量浓度约1g·mL⁻¹。

2.1.2 干姜汁 干姜用量为生姜用量的1/3。取干姜33.33g,加10倍量水浸泡1h,加热微沸后煎煮30min,过滤,滤渣加8倍量水煎煮30min,合并2次滤液,水浴浓缩至100mL,得干姜汁生药质量浓度约0.33g·mL⁻¹。

2.2 黄连及其炮制品的制备^[8]

2.2.1 生黄连 取适量黄连药材,除去杂质,抢水洗净,润透,切薄片,干燥后备用。

2.2.2 生姜、干姜制黄连 取生黄连饮片100g,共2份,分别加入生姜汁、干姜汁各10g,拌匀,闷润至姜汁吸尽后,置炒锅内,于120℃炒制15min,取出晾凉,晒去碎屑,备用。

2.3 黄连水煎液的制备^[9] 分别取生黄连、生姜制黄连、干姜制黄连饮片各50g,加10倍量水浸泡1h,加热微沸后煎煮30min,过滤,药渣加8倍量水煎煮30min,过滤,合并2次滤液,水浴浓缩至50mL,得药液生药质量浓度约1g·mL⁻¹,4℃冰箱冷藏备用。

2.4 不同姜汁制黄连抑制大鼠胃黏膜损伤的作用

2.4.1 动物分组和给药^[10] SD大鼠适应性饲养3d,随机分为7组,分别为空白组、模型组、生姜汁组、干姜汁组、生黄连组、生姜制黄连组、干姜制黄连组,每组8只。给药组每天分别灌胃生姜汁、干姜汁、生黄连、生姜制黄连、干姜制黄连水煎液各3mL

(均含生药 3 g), 空白组和模型组均给予相应体积生理盐水, 连续给药 7 d, 取材前 1 d 禁食不禁水 18 h, 末次给药后 1 h, 模型组和各给药组均灌服无水乙醇 0.8 mL, 空白组灌服等量生理盐水。

2.4.2 指标检测^[11] 灌服无水乙醇 1 h 后, 按剂量 10 mL·kg⁻¹ 腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉后解剖, 腹主动脉取血, 于 4 °C, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液置 -20 °C 冰箱保存, 采用 ELISA 测定大鼠血浆中 IL-8, TNF-α 和 6-keto-PGF_{1α} 的含量。采血后结扎幽门和贲门, 取下全胃。1 h 后沿胃大弯剪开, 生理盐水冲洗干净, 平铺于滤纸上, 计算胃黏膜损伤指数。胃黏膜损伤呈条状时, 测量其长度, 每 1 mm 记为 1 分, 宽度 >1 mm 时, 计分加倍; 呈点状时(长、宽均 >1 mm), 计为 0.5 分, 呈斑块状时(长、宽均 >2 mm), 计算面积, 将上述测量结果相加, 即为大鼠的胃黏膜损伤指数。每组随机抽取 6 个胃, 取一小

块胃窦部组织放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 用石蜡包埋, HE 染色制成胃组织病理切片, 光镜下观察组织学改变。

2.5 统计方法 数据采用 SPSS 19.0 进行统计处理, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两样本均数的 *t* 检验, 组间样本均数比较采用方差分析, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2.6 大鼠胃黏膜损伤指数 见表 1。结果与模型组比较, 生姜汁组、干姜汁组、生黄连组、生姜制黄连组和干姜制黄连组胃黏膜损伤指数均有极显著地下降 (*P* < 0.01), 证明姜汁和黄连均有抑制胃黏膜损伤的作用。与生黄连组比较, 生姜制黄连组和干姜制黄连组胃黏膜损伤指数显著降低 (*P* < 0.05), 证明黄连经过姜汁炮制后能增强其抑制胃黏膜损伤的作用。且生姜汁与干姜汁相比, 采用生姜汁炮制的生姜制黄连组胃黏膜损伤指数更低。

表 1 不同姜汁制黄连对大鼠胃黏膜损伤指数及血浆中 IL-8, TNF-α 和 6-keto-PGF_{1α} 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of Coptidis Rhizoma processed by different ginger juice on gastric mucosal injury index and levels of IL-8, TNF-α and 6-keto-PGF_{1α} in plasma of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	损伤指数	IL-8/ng·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹	6-keto-PGF _{1α} /ng·L ⁻¹
空白	-	130.59 ± 25.41 ³⁾	28.46 ± 2.63 ³⁾	124.70 ± 32.61 ^{3,4)}
模型	44.44 ± 19.86	196.39 ± 49.46 ¹⁾	39.98 ± 12.71 ^{1,4)}	69.23 ± 8.60 ¹⁾
生姜汁	21.56 ± 10.19 ²⁾	161.45 ± 59.45	30.92 ± 8.19 ³⁾	91.35 ± 13.21 ¹⁾
干姜汁	24.44 ± 13.56 ²⁾	192.19 ± 40.24 ¹⁾	32.59 ± 3.34	84.37 ± 19.31 ¹⁾
生黄连	9.67 ± 6.44 ²⁾	157.29 ± 90.90	28.49 ± 9.25 ³⁾	105.03 ± 28.17 ³⁾
生姜制黄连	4.00 ± 1.85 ^{2,5)}	136.59 ± 55.67 ³⁾	27.53 ± 4.56 ³⁾	114.34 ± 41.24 ³⁾
干姜制黄连	4.11 ± 1.78 ^{2,5)}	140.73 ± 73.34 ³⁾	28.06 ± 3.82 ³⁾	109.56 ± 30.80 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05; 与模型组比较²⁾ *P* < 0.01, ³⁾ *P* < 0.05; 与生姜汁组比较⁴⁾ *P* < 0.05; 与生黄连组比较⁵⁾ *P* < 0.05。

2.7 血浆中生化指标的改变 见表 1。结果与空白组比较, 模型组 IL-8 和 TNF-α 含量显著升高 (*P* < 0.05), 6-keto-PGF_{1α} 含量则明显降低 (*P* < 0.05)。给药后 IL-8 和 TNF-α 的含量均有所下降, 而 6-keto-PGF_{1α} 含量则有所上升, 且姜制后作用更强。表明姜汁和黄连可能通过降低 IL-8 和 TNF-α 的含量, 提高 6-keto-PGF_{1α} 的含量来降低胃黏膜损伤。生姜汁组和干姜汁组、生姜制黄连组与干姜制黄连组比较时, 3 种指标的含量在数值上也存在一定差异。

2.8 大鼠胃黏膜损伤病理组织学观察 结果见图 1。正常大鼠胃黏膜可分为黏膜上皮细胞、固有层和黏膜肌层, 胃黏膜上皮由单层柱状细胞紧密排列而成的完整上皮组织, 且排列整齐, 黏膜层内未见炎性细胞浸润; 而模型组大鼠大量胃黏膜上皮细胞坏死脱落, 黏膜下血管内出现以淋巴细胞为主的炎症细

胞浸润, 同时黏膜固有层、黏膜肌层变薄且肌层紊乱、下缘缺损^[12]。生姜汁组、干姜汁组、生黄连组、生姜制黄连组、干姜制黄连组损伤程度较模型组均有明显改善, 且姜黄连组大鼠胃黏膜损伤程度较生黄连组轻, 证明黄连姜制后抑制胃黏膜损伤的效果增强。而生姜汁组与干姜汁组相比, 生姜汁组损伤较轻。

3 讨论

消化性溃疡、胃溃疡为临床常见、多发疾病, 二者主要是指胃黏膜被胃消化液自身消化造成的超过黏膜肌层的组织损伤, 是发生于幽门和贲门之间的炎性坏死性病变^[13]。若不及时治疗很容易发生穿孔、出血、梗阻以及胃溃疡癌变, 给患者带来很大的痛苦^[14]。因此, 长期以来保护胃黏膜一直是临床研究的重点和热点, 但是胃黏膜损伤的病因和发病机

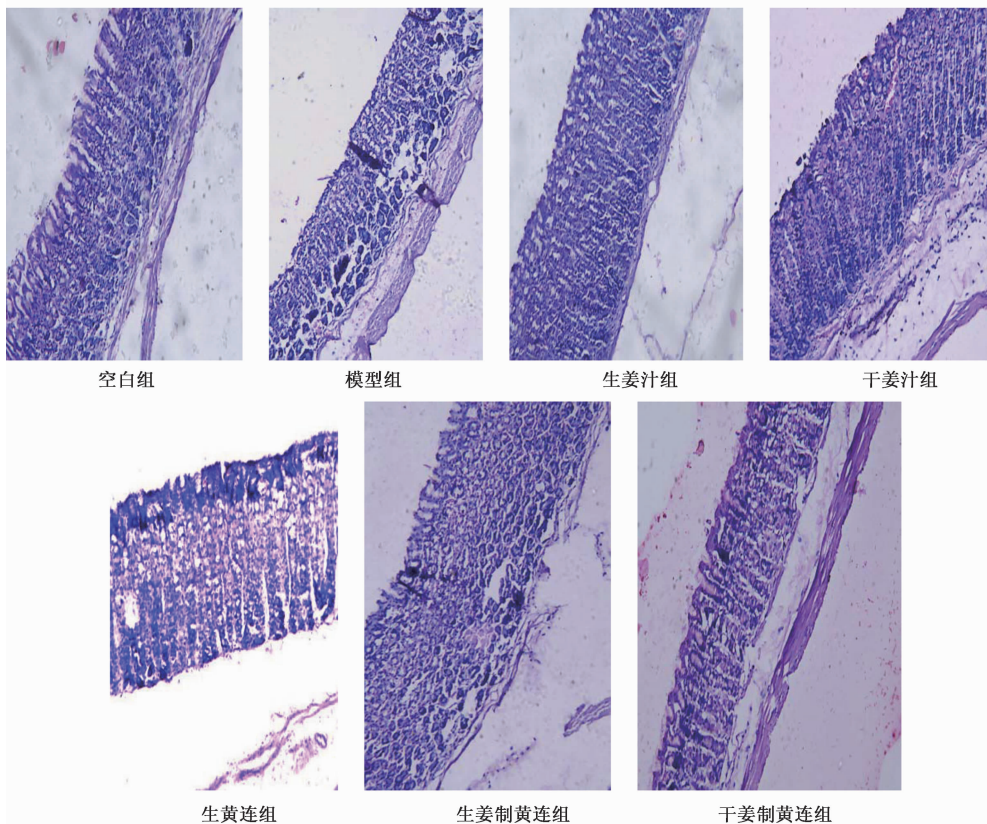


图 1 不同姜汁制黄连大鼠胃黏膜的病理切片(HE, ×100)

Fig. 1 Pathological sections of gastric mucosa treated with *Coptidis Rhizoma* processed by different ginger juice (HE, ×100)

制复杂,尚未完全明确,一般认为主要与胃黏膜的防御因子(胃黏液-黏膜屏障、黏膜血流量、前列腺素、表皮生长因子和细胞更新等)和攻击因子[胃酸,胃蛋白酶,幽门螺杆菌(HP)感染,乙醇和药物等]失衡有关。

目前,中药和化药治疗均能取得了较好的近期疗效,但复发率高,因此,防止胃溃疡复发成为治疗胃溃疡的关键。近年有研究表明溃疡瘢痕部位的炎症反应是影响溃疡愈合的关键^[15],其中 IL-6, IL-8 和 TNF- α 等细胞因子在胃黏膜损伤中起着重要作用,对胃黏膜的发生、发展及修复产生了广泛的影响^[16]。IL-8 是目前已知最强的多形核白细胞趋化和激活因子,可以在一定程度上反映胃黏膜损伤的程度^[17]。TNF- α 主要由活化的单核细胞和巨噬细胞产生,具有上调血管内皮细胞黏附分子的表达,诱导内皮细胞产生血小板活化因子和趋化性细胞因子 IL-8 的功能^[18],前列腺素(PG)是公认的胃黏膜防御修护因子,可通过增加胃黏膜黏液,清除氧自由基及促进表面活性磷脂的释放等机制保护胃黏膜,其广泛分布于消化道,以 PGE₂, PGI₂ 最重要。6-keto-PGF_{1 α} 为前列环素(PGI)稳定的代谢产物,可代表其含量。由于 PGI 生物半衰期短,故测定 6-keto-PGF_{1 α}

的含量能反映血浆 PGI 的含量^[19]。故本文选 IL-8, TNF- α 和 6-keto-PGF_{1 α} 来探究不同姜汁制黄连抑制胃黏膜损伤的作用机制。

由于酒精性胃黏膜损害在临床上越来越常见,且乙醇对胃黏膜的影响十分显著,与多种胃黏膜病变密切相关,因此,本文选用乙醇致大鼠胃黏膜损伤模型。胃黏膜损伤指数打分以及病理组织学变化均表明黄连和姜汁均能较好地抑制乙醇所致大鼠胃黏膜损伤,姜汁炮制之后黄连抑制胃黏膜损伤的作用增强,符合中医药理论认为的黄连姜制后增强了清胃和胃止呕的功效。生姜汁在抑制胃黏膜损伤方面作用较干姜汁好,其差异产生的原因可能是干姜在干燥过程中挥发油的大量丢失所导致^[20],具体机制仍有待进一步研究证实。不同姜汁制黄连均能显著抑制乙醇造模所引起的血浆中 IL-8 和 TNF- α 含量升高,提高血浆中 6-keto-PGF_{1 α} 的含量,姜制之后作用更强。说明姜制黄连通过抑制促炎因子 IL-8 和 TNF- α 的释放和提高血液中 6-keto-PGF_{1 α} 的含量,增强胃黏膜的自我保护能力来提高黄连抑制胃黏膜损伤的作用。

综上所述,黄连姜制之后抑制胃黏膜损伤的作用增强,与传统炮制理论相吻合,初步证实了其作用

机制与抑制促炎因子的释放和促进胃黏膜修护因子的释放有关,可为阐明姜黄连的炮制机制和验证传统炮制理论提供参考,还可为不同姜汁炮制黄连的选择以及姜黄连饮片质量的改善提供实验依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:303.

[2] 张丽莉,高文远,闫娟娟,等. 抗溃疡中药的研究概况[J]. 中成药,2009,31(11):1738-1741.

[3] 钟凌云,廖智慧,祝婧,等. 黄连姜制前后对乙醇致小鼠胃黏膜损伤的保护作用及机制探究[J]. 中成药,2013,35(4):788-791.

[4] 姚东云,刘永芹,刘淑彦,等. 小议生姜与干姜之别[J]. 中国乡村医药杂志,2011,18(11):40-41.

[5] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:264.

[6] 钟凌云,吕沐,何平平. 作炮制辅料用的不同姜汁对胃肠作用的差异比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(6):19-22.

[7] 何平平,钟凌云. 干姜、生姜及其炮制辅料姜汁的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(6):219-223.

[8] 文小女,钟凌云. 正交试验优选樟帮姜黄连的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(15):18-20.

[9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:67.

[10] 李备. 黄连总碱对实验性胃溃疡的作用研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2005.

[11] 刘密,常小荣,严洁,等. 艾灸预处理对大鼠应激性胃

黏膜损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2012,27(1):58-62.

[12] 林晓春,陈育尧,白殊同,等. 甘草总黄酮对慢性浅表性胃炎大鼠胃粘膜损伤的保护作用[J]. 南方医科大学学报,2013,33(2):299-304.

[13] 孙玉鹤,张春风. 胃溃疡研究进展[J]. 亚太传统医药,2014,10(11):46-48.

[14] 叶任高. 内科学[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社,2002:398-399.

[15] 林莉,杜惠莲,李琦. 返魂草提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜炎症反应的调节作用[J]. 中华中医药学刊,2010,28(6):1298-1300.

[16] 张青蓓,马俊江. 细胞因子在消化道溃疡发生发展及修复过程中的作用[J]. 中国临床药理学杂志,1999,15(1):73-76.

[17] 陈艳芬,陈蔚文,李茹柳,等. 左金丸与反左金对寒热型胃黏膜损伤炎症因子和保护因子的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2003,11(3):133-135.

[18] Watanabe T, Higuchi K, Tominaga K, et al. Acid regulates inflammatory response in a rat model of induction of gastric ulcer recurrence by interleukin 1 β [J]. Gut,2001,48(6):774-781.

[19] 赵剑锋,王晞星,刘丽坤,等. 胃肠康定胶囊对 NSAIDs 所致大鼠胃黏膜损伤模型 6-keto-PGF_{1 α} 、PGE₂ 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(4):393-395.

[20] 王金华,薛宝云,梁爱华. 生姜与干姜药理活性的比较研究[J]. 中国药理学杂志,2000,35(3):163-165.

[责任编辑 刘德文]