

· 配伍 ·

葛花、枳椇子及其配伍对小鼠急性酒精性胃黏膜损伤的保护作用及机制

廖文勇, 李慕云, 董肖, 曹灿, 霍敏, 任彧娜, 柳海艳,
修琳琳, 贺成, 范盎然, 陈绍红*, 钟赣生*
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤的改善作用,为进一步开展葛花、枳椇子及其配伍防治酒精致多脏器损伤奠定基础。方法:采用多次灌胃给予56%红星二锅头白酒($15\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)建立小鼠急性酒精性胃黏膜损伤模型,将120只ICR雄性小鼠随机分为空白组、模型组、奥美拉唑组($0.026\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、葛花-枳椇子(配伍)高、中、低剂量组(29.2 、 14.6 、 $7.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、葛花组($19.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、枳椇子组($19.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)共8个组,每组15只,动物适应性喂养1周后,按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 预给相应药物3 d,从第4天开始,给药1 h后按 $15\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃二锅头白酒,空白组给予相同体积去离子水,记录小鼠醉酒和醒酒时间,连续给药给酒3 d,末次给药1 h后摘眼球处死;气相色谱仪测定各组小鼠血清中乙醇体积分数,紫外-可见分光光度计检测各组小鼠胃黏膜中乙醇脱氢酶(ADH)活性;苏木素-伊红(HE)染色观察胃黏膜病理变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组小鼠血清中炎症因子含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测核转录因子- κB (NF- κB)p65和NF- κB 抑制蛋白 α (I $\kappa\text{B}\alpha$)mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组血清中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量升高($P<0.05$),胃黏膜组织NF- κB p65 mRNA表达升高($P<0.01$),I $\kappa\text{B}\alpha$ mRNA表达降低($P<0.01$);与模型组比较,奥美拉唑组、配伍高、中剂量组、葛花组醉酒时间延长($P<0.05$),配伍高、中剂量组醒酒时间缩短($P<0.05$),配伍高剂量组血清中乙醇体积分数降低($P<0.05$),奥美拉唑组、配伍高、中剂量组胃黏膜中ADH活性升高($P<0.05$),配伍各剂量组、葛花组肉眼损伤评分降低($P<0.05$),奥美拉唑组、配伍各剂量组、葛花组病理损伤评分降低($P<0.01$),各给药组血清中IL-6表达降低($P<0.05$),奥美拉唑组、配伍各剂量组、枳椇子组血清中IL-1 β 表达降低($P<0.05$),配伍高、中剂量组血清中TNF- α 表达降低($P<0.05$),各给药组胃黏膜组织NF- κB p65 mRNA表达降低($P<0.05$),奥美拉唑组、配伍各剂量组胃黏膜组织I $\kappa\text{B}\alpha$ mRNA表达增加($P<0.05$);与高剂量组比较,配伍低剂量组与枳椇子组醉酒时间缩短($P<0.01$),葛花、枳椇子组醒酒时间延长($P<0.01$),配伍中、低剂量组、葛花组、枳椇子组血清中乙醇体积分数升高($P<0.05$),配伍中、低剂量组、枳椇子组肉眼损伤评分增加($P<0.05$),配伍中、低剂量组、葛花组、枳椇子组病理损伤评分增加($P<0.01$),配伍低剂量组、葛花组、枳椇子组血清中IL-1 β 含量升高($P<0.01$),葛花组与枳椇子组胃黏膜组织I $\kappa\text{B}\alpha$ mRNA表达量降低($P<0.05$);与配伍中剂量组比较,枳椇子组醉酒时间缩短($P<0.05$),葛花组醒酒时间延长($P<0.05$),葛花组、枳椇子组病理损伤评分增加($P<0.01$),配伍低剂量组、葛花组、枳椇子组血清中IL-1 β 含量升高($P<0.05$);与配伍低剂量组比较,枳椇子组病理损伤评分增加($P<0.05$)。结论:葛花、枳椇子及其配伍能起到对小鼠急性酒精性胃黏膜损伤的防治作用,可能与抑制胃黏膜NF- κB 信号通路的表达有关,且配伍高剂量组药效最佳。

[关键词] 葛花; 枳椇子; 急性胃黏膜损伤; 乙醇代谢; 炎症反应

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0039-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230243

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230209.1736.004.html>

[网络出版日期] 2023-02-10 10:18:19

[收稿日期] 2022-11-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703723);北京中医药大学校级科研纵向发展基金项目(2021-ZXFZJJ-033)

[第一作者] 廖文勇,在读硕士,从事中药药性理论研究,E-mail:915694554@qq.com

[通信作者] *陈绍红,博士,副教授,从事中药药性理论研究,E-mail:chshh77@163.com;

*钟赣生,硕士,教授,博士生导师,从事中药药性理论研究,E-mail:zhonggansheng@sohu.com

Protective Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen, and Their Compatibility on Acute Alcoholic Gastric Mucosal Injury in Mice and Mechanism

LIAO Wenyong, LI MUYUN, DONG XIAO, CAO Can, HUO Min, REN Yuna, LIU Haiyan, XIU Linlin, HE Cheng, FAN Angran, CHEN Shaohong*, ZHONG Gansheng*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the improvement effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen, and their compatibility on acute alcoholic gastric mucosal injury, and lay a foundation for further development of Flos Puerariae, Hoveniae Semen, and their compatibility in the prevention and treatment of alcohol-induced multiple organ injury. **Method:** The acute alcohol-induced gastric mucosal injury model of mice was established by multiple intragastric administration of 56% Hongxing Erguotou liquor ($15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$). A total of 120 male ICR mice were randomly divided into 8 groups, namely, the blank group, model group, omeprazole group ($0.026 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Flos Puerariae-Hoveniae Semen (compatibility) high, medium, and low-dose groups ($29.2, 14.6, 7.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Flos Puerariae group ($19.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and Hoveniae Semen group ($19.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 15 mice in each group. After one week of adaptive feeding, the animals were pre-administrated with the corresponding drug at the rate of $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 3 d. From the 4th day, after 1 h of administration, Erguotou liquid was administrated at the rate of $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ and the blank group was administrated with the same volume of deionized water to record the drunkenness and sober up time. The administration was lasted for 3 d. One hour after the last administration, the eyeballs were removed and the mice were sacrificed. The concentration of ethanol in serum was determined by gas chromatograph, and the activity of ethanol dehydrogenase (ADH) in gastric mucosa was determined by ultraviolet-vis spectrophotometer. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in gastric mucosa. Serum inflammatory factors were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of nuclear transcription factor- κB (NF- κB) p65 and NF- κB inhibitory protein α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As compared with the normal group, the content of interleukin-6 (IL-6), interleukin- 1β (IL- 1β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum of mice in the model group was increased ($P < 0.05$), the mRNA expression of NF- κB p65 in gastric mucosa tissues was increased ($P < 0.01$), and the mRNA expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ was decreased ($P < 0.01$). As compared with the model group, the drunkenness time of the omeprazole group, high and medium-dose compatibility groups, and Flos Puerariae group was prolonged ($P < 0.05$), the sober up time of the high and medium-dose compatibility groups was shortened ($P < 0.05$), the ethanol concentration in the serum of the high-dose compatibility group was decreased ($P < 0.05$), the ADH activity in the gastric mucosa of the omeprazole group and high and medium-dose compatibility groups was increased ($P < 0.05$), the macroscopic injury score of the high, medium, and low-dose compatibility groups and Flos Puerariae group was decreased ($P < 0.05$), the score of pathological injury in the omeprazole group, high, medium, and low-dose compatibility groups, and Flos Puerariae group was decreased ($P < 0.01$), the expression of IL-6 in serum of all drug groups was decreased ($P < 0.05$), the expression of IL- 1β in serum of the omeprazole group, high, medium, and low-dose Flos Puerariae groups, and Hoveniae Semen group was decreased ($P < 0.05$), the expression of TNF- α in serum of high and medium-dose groups was decreased ($P < 0.05$), the mRNA expression of NF- κB p65 in gastric mucosa tissues of all drug groups was decreased ($P < 0.05$), and the mRNA expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in gastric mucosa tissues of the omeprazole group and high, medium, and low-dose compatibility groups was increased ($P < 0.05$). As compared with the high-dose compatibility group, the drunkenness time in

the low-dose compatibility group and Hoveniae Semen group was shortened ($P<0.01$), the sober up time in the Flos Puerariae and Hoveniae Semen groups was prolonged ($P<0.01$), the concentration of ethanol in the serum of the medium and low-dose compatibility groups, Flos Puerariae group, and Hoveniae Semen group increased ($P<0.05$), the macroscopic injury score of the medium and low-dose compatibility groups and Hoveniae Semen group was increased ($P<0.05$), the pathological injury score of the medium and low-dose compatibility groups, Flos Puerariae group, and Hoveniae Semen group was increased ($P<0.01$), the content of IL-1 β in serum of low-dose compatibility group, Flos Puerariae group, and Hoveniae Semen group was increased ($P<0.01$), and the mRNA expression of I κ B α in gastric mucosa of the Flos Puerariae group and Hoveniae Semen group was decreased ($P<0.05$). As compared with the medium-dose compatibility group, the drunkenness time in the Hoveniae Semen group was shortened ($P<0.05$), the sober up time in the Flos Puerariae group was prolonged ($P<0.05$), the pathological injury score in the Flos Puerariae group and Hoveniae Semen group was increased ($P<0.01$), and the content of IL-1 β in serum of the low-dose compatibility group, the Flos Puerariae group, and Hoveniae Semen group was increased ($P<0.05$). As compared with the low-dose compatibility group, the pathological injury score of the Hoveniae Semen group was increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Flos Puerariae, Hoveniae Semen, and their compatibility play a role in preventing and treating acute alcoholic gastric mucosal injury in mice, which may be related to the inhibition of the expression of NF- κ B signal pathway in gastric mucosa, and the high-dose compatibility group has the optimal effect.

[Keywords] Flos Puerariae; Hoveniae Semen; acute gastric mucosal injury; ethanol metabolism; inflammatory reaction

饮酒是人们普遍的生活习惯,但是酗酒或大量饮酒是造成胃黏膜损伤的主要原因之一^[1],且乙醇致急性胃黏膜损伤的发病率在逐年升高^[2],严重影响人体健康。

葛花和枳椇子为我国传统解酒专药,梁代《本草经集注》所收录的《名医别录·中品·卷二》最早记载葛花“主消酒”,《滇南本草》第二卷中记载葛花:“解酒醒脾胃,酒毒酒痢,饮食不思,胸膈饱胀发呃,呕吐酸痰,酒毒伤胃,吐血呕血。消热,解酒毒”。枳椇子解酒功效最早记载于唐代《新修本草》,其第十四卷记载枳椇子“味甘,平,无毒……陆机云:一名木蜜。其木皮,温,无毒,主五痔,和五脏。以木为屋,屋中酒则味薄,此亦奇物”。

葛花发散宣透,引酒湿之邪从肌表而散;枳椇子渗泄利尿,使酒湿之邪从小便而下,二者配伍,散渗结合,分消湿浊,使酒湿邪气排出体外,可以起到解酒护胃的作用。且现代研究表明葛花、枳椇子具有抗炎^[3-6]、加速乙醇代谢^[7-8]、保护胃黏膜的作用^[9-11]。

课题组前期研究发现,葛花枳椇子配伍能够起到对酒精性肝损伤的保护作用^[7,12-13],且葛花-枳椇子(2:1)配伍组在加速乙醇代谢、保护肝脏损伤方面优于其他给药组,为最佳治疗组。而乙醇对人体多脏器都有损伤,大量喝酒,乙醇在胃中停留吸收,

对胃有直接损伤。故本研究选取前期研究效果最佳的葛花-枳椇子(2:1)配伍组,设置高、中、低剂量组,增加对照组,即单用葛花组和单用枳椇子组,探讨葛花、枳椇子及其配伍对小鼠急性酒精性胃黏膜损伤的防治效果,以及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 120只ICR雄性小鼠,4周龄,体质量18~20g。动物购自于斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。动物饲养于北京中医药大学SPF级动物房,室内温度(22±2)℃,湿度60%~70%。动物饲料为清洁级鼠饲料,饮用水为去离子水。本研究经北京中医药大学动物伦理委员会批准,伦理编号BUCM-4-2021080602-3040。

1.2 药物与试剂 葛花(产地湖南,批号20092309),枳椇子(产地陕西,批号20101608),以上饮片购自北京同仁堂(新悦都店),经北京中医药大学中医学院方药系李伟老师鉴定为优质药材;奥美拉唑(山西津华晖星制药有限公司,国药准字H20045944);56%红星二锅头白酒(北京红星股份有限公司);苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉Servicebio公司,货号G1003);小鼠白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美

国 Raybiote 公司, 货号分别为 ELM-IL6-1、ELM-IL1 β -1、ELM-TNF α -1); 乙醇脱氢酶(ADH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 货号 A083-2-1); BCA 蛋白含量检测试剂盒(凯基生物技术股份有限公司, 货号 KGP902); 组织细胞 RNA 小量提取试剂盒(广州美基生物科技有限公司, 货号 R4111-02); cDNA 第一链合成试剂盒(美国 Thermo 公司, 货号 K1622); Power Sybr Green PCR Master Mix(美国 Invitrogen 公司, 货号 4367659)。

1.3 仪器 华卫德朗 DR-200BS 型酶标分析仪(无锡华卫德朗仪器有限公司); MM400 型冷冻混合球磨仪(德国 Retsch 公司); 7890N 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司); 7694E 型顶空自动进样器(美国安捷伦公司); Centrifuge5424R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); Spectra Max Quick Drop 型微量分光光度计(上海美谷分子仪器有限公司); A600 型基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司); CFX96™ Optics Module 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)系统、GS-900™ Calibrated Densitometry System 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药液制备^[14-15] 葛花及枳椇子煎液: 取葛花或枳椇子加水浸泡 2 h, 再加水煎煮 2 次, 第 1 次加入 10 倍量水, 煎煮 2 h, 第 2 次加 8 倍量水, 煎煮 1 h, 煎液合并, 浓缩至含生药质量浓度为 1.95 g·mL⁻¹ 的溶液, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 给药剂量为 19.5 g·kg⁻¹, 相当于临床人用量的 10 倍(按成人 1 次常规用量 15 g 计算)。

葛花-枳椇子 2:1(高、中、低剂量组)煎液: 按照 2:1 比例配伍取葛花和枳椇子, 加水浸泡 2 h, 再加水煎煮 2 次, 第 1 次加 10 倍量水, 煎煮 2 h, 第 2 次加 8 倍量水, 煎煮 1 h, 煎液合并, 浓缩至含生药 2.92、1.46、0.73 g·mL⁻¹ 的溶液, 分别作为高、中、低质量浓度, 给药体积均为 10 mL·kg⁻¹, 给药剂量为 29.2、14.6、7.3 g·kg⁻¹, 分别相当于临床人用量的 10、5、2.5 倍(按成人 1 次常规用量 22.5 g 计算)。

奥美拉唑溶液: 用蒸馏水配置成 2.6 g·L⁻¹ 的奥美拉唑溶液使用, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 给药剂量为 0.026 g·kg⁻¹, 相当于临床人用量的 10 倍(按成人 1 次口服 20 mg 计算)。

2.2 分组及模型复制 将 120 只 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组、奥美拉唑组、葛花-枳椇子高、中、低剂量组、葛花组、枳椇子组共 8 个组, 每组 15 只。

模型复制: 动物适应性喂养 1 周后, 灌胃给予相

应药物 3 d, 给药剂量为 10 mL·kg⁻¹, 空白组和模型组给予同体积去离子水, 从第 4 天开始, 给药 1 h 后灌胃红星二锅头白酒, 给酒剂量 15 mL·kg⁻¹, 空白组给予相同体积去离子水, 连续 3 d, 末次给药 1 h 后摘眼球取血, 脱颈椎处死, 取胃组织待测。

2.3 小鼠醉酒时间及醒酒时间观察 第 1 次灌胃给酒后记录给酒时间, 并记录小鼠翻正反射消失及恢复时间。小鼠醉酒时间为翻正反射消失时间减去给酒时间, 小鼠醒酒时间为翻正反射恢复时间减去翻正反射消失时间。

2.4 血清中乙醇体积分数和胃黏膜组织 ADH 活性测定 小鼠摘眼球取血, 静置 4 h 后, 以 4 °C、3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 4.5 cm), 取上清液 100 μ L 加入 10 mL 顶空瓶中, 用顶空气相色谱仪检测血中乙醇浓度; 取胃黏膜组织 30 mg 加入 9 倍体积生理盐水匀浆制备液体, 用 BCA 蛋白试剂盒测出样品蛋白浓度后, 按照 ADH 试剂盒说明书步骤操作, 采用紫外可见分光光度计检测胃中 ADH 活性。

2.5 胃黏膜损伤程度的评估 沿胃大弯剪开, 洗净胃内容物, 展开胃黏膜, 拍照并用游标卡尺测量出血点或出血带的长度和宽度。按照 Guth 标准进行胃黏膜损伤评分^[16]: 正常胃黏膜为 0 分, 点状出血点计 1 分, 出血带长度 < 1 mm 计 2 分, 1 \leq 出血带长度 < 2 mm 计 3 分, 2 \leq 出血带长度 < 4 mm 计 4 分, 出血带长度 \geq 4 mm 计 5 分。出血带宽度 \geq 2 mm, 损伤指数计分 $\times 2$ 。

2.6 HE 染色观察胃黏膜病理形态 将固定好的胃黏膜组织脱水、石蜡包埋、切片, 放入 37 °C 恒温箱中烘干, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇浸泡, 蒸馏水浸泡。苏木素水溶液染色, 3 min 后转移至 1% 盐酸乙醇分化液中分色, 各 10 s, 流水冲洗后蒸馏水浸泡, 将切片放入伊红染色液中染色 5 min 后梯度乙醇脱水, 经二甲苯透明后, 中性树脂封片, 使用数字病理扫描系统扫描玻片。光镜下观察并进行胃黏膜损伤评分^[17], 评分标准见表 1, 病变总积分 = 充血积分 + 出血积分 $\times 2$ + 上皮细胞脱落坏死积分 $\times 3$ 。

2.7 ELISA 检测血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达 按照 ELISA 试剂盒说明配制标准品和样品, 使用 DR-200BS 酶标仪测定 450 nm 处对照品的浓度及吸光度 A 并绘制标准曲线, 将样品 A 代入标准曲线, 计算各样品中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的实际浓度。

2.8 Real-time PCR 检测胃黏膜组织 NF- κ B p65、I κ B α mRNA 的表达 切取胃组织约 35 mg, 按照试剂盒规定步骤提取肾脏总 RNA, -80 °C 保存; 用超

表1 急性酒精性胃黏膜损伤评分标准

Table 1 Scoring criteria for acute alcoholic gastric mucosal injury

评分/分	充血面积/上皮全层面积	出血面积/上皮全层面积	上皮细胞脱落坏死/上皮全层面积
1	<1/5	<1/5	<1/5
2	1/5~2/5	1/5~2/5	1/5~2/5
3	2/5~3/5	2/5~3/5	2/5~3/5
4	3/5~4/5	3/5~4/5	3/5~4/5
5	1	1	1

微量分光光度计读取并记录提取的总RNA浓度值,同时根据 A_{260}/A_{280} 分析RNA纯度,选用 A 在1.8~2.0的样品;按照cDNA第一链合成试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,配置反应体系20 μ L。逆转录反应条件为42 $^{\circ}$ C逆转录60 min,70 $^{\circ}$ C逆转录酶失活5 min。稀释逆转录产物得最终cDNA。配置扩增体系,进行PCR扩增,扩增反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C变性10 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,40个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析,内参选择 β -肌动蛋白(β -actin),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表2。

2.9 统计学分析 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据方差齐,多

表2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 AGATTACTGCTCTGGCTCCTAG 下游 TCGTACTCCTGCTTGCTGAT	141
NF- κ B p65	上游 GACCTGGCATCTGTGGACAACCTC 下游 CCGCAATGGAGGAGAAGTCTTCATC	220
I κ B α	上游 ATCACCAACCAGCCAGGAATTGC 下游 ACATCAGCACCCAAAGTCACCAAG	269

组比较采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD);若方差不齐,采用Dunnett's检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠醉酒时间与醒酒时间的影响 与模型组比较,奥美拉唑组、葛花-枳椇子高、中剂量组、葛花组醉酒时间明显延长($P < 0.05, P < 0.01$),葛花-枳椇子高、中剂量组醒酒时间明显缩短($P < 0.05, P < 0.01$);与葛花-枳椇子高剂量组比较,葛花-枳椇子低剂量组与枳椇子组醉酒时间显著缩短($P < 0.01$),葛花组、枳椇子组醒酒时间显著延长($P < 0.01$);与葛花-枳椇子中剂量组比较,枳椇子组醉酒时间明显缩短($P < 0.05$),葛花组醒酒时间明显延长($P < 0.05$)。见表3。

表3 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠醉酒时间与醒酒时间的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on drunken and sober time in mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	醉酒时间	醒酒时间
模型组		8.31 \pm 3.95	345.36 \pm 95.72
奥美拉唑组	0.026	32.92 \pm 20.23 ³⁾	343.62 \pm 89.41
葛花-枳椇子高剂量组	29.2	42.83 \pm 9.19 ⁴⁾	206.30 \pm 84.79 ⁴⁾
葛花-枳椇子中剂量组	14.6	31.80 \pm 15.35 ³⁾	251.67 \pm 117.19 ³⁾
葛花-枳椇子低剂量组	7.3	16.45 \pm 8.31 ⁶⁾	278.47 \pm 105.86
葛花组	19.5	17.00 \pm 5.41 ³⁾	348.30 \pm 88.32 ^{6,7)}
枳椇子组	19.5	7.38 \pm 3.62 ^{6,7)}	309.43 \pm 80.95 ⁶⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与葛花-枳椇子高剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与葛花-枳椇子中剂量组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$;与葛花-枳椇子低剂量组比较⁹⁾ $P < 0.05$,¹⁰⁾ $P < 0.01$ (表4-表8同)

3.2 对小鼠血清中乙醇浓度与胃黏膜中ADH活性影响 与模型组比较,葛花-枳椇子高剂量组血清中乙醇浓度明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,奥美拉唑组、葛花-枳椇子高、中剂量组胃黏膜中ADH活性明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与高剂量组比较,葛花-枳椇子中、低剂量组、葛花组、枳椇子组血清中乙醇浓度明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4。

3.3 对小鼠胃黏膜损伤情况及分数影响 与空白

组比较,模型组小鼠胃黏膜损伤出血、水肿较为严重,说明急性酒精性胃黏膜损伤模型复制成功,各给药组相较于模型组,胃黏膜损伤皆有改善,且葛花-枳椇子高剂量组损伤最小,优于葛花-枳椇子中、低剂量组、葛花组与枳椇子组;与模型组比较,葛花-枳椇子高、中、低剂量组、葛花组损伤积分均明显减少($P < 0.05, P < 0.01$),其余给药组与模型组比较,损伤积分虽有降低,但差异无统计学意义;与葛花-枳

表4 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠血清中乙醇体积分数和胃黏膜中ADH的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 4 Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on ethanol volume fraction and ADH of mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	乙醇体积分数 /mL·L ⁻¹	ADH活性 /U·mg ⁻¹
模型组		5.95±1.53	2.22±1.12
奥美拉唑组	0.026	5.88±1.28	3.95±1.46 ³⁾
葛花-枳椇子高剂量组	29.2	3.99±0.78 ³⁾	4.39±2.27 ⁴⁾
葛花-枳椇子中剂量组	14.6	5.87±1.96 ⁶⁾	4.12±2.22 ³⁾
葛花-枳椇子低剂量组	7.3	5.85±1.30 ⁶⁾	3.64±2.21
葛花组	19.5	5.34±2.19 ⁵⁾	3.49±1.58
枳椇子组	19.5	5.63±1.95 ⁶⁾	3.55±1.65

椇子高剂量组比较,葛花-枳椇子中、低剂量组、枳椇子组损伤积分均明显增加($P<0.05, P<0.01$)。见表5、图1。

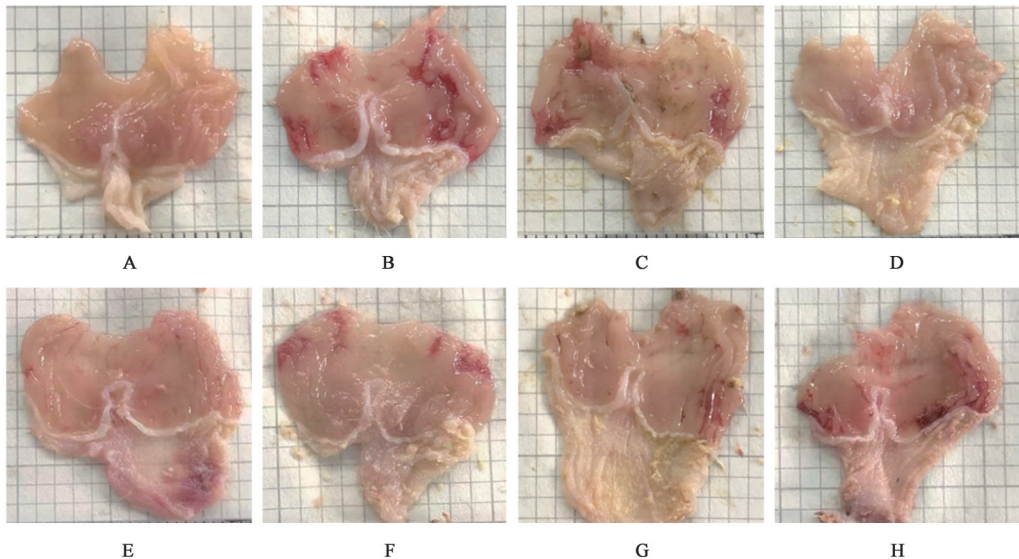
3.4 对小鼠胃黏膜病理组织变化及病理损伤积分影响 空白组小鼠胃黏膜光滑完整、无上皮细胞脱落或坏死、无出血及充血、无炎性细胞浸润现象,模型组小鼠胃黏膜上皮细胞大量脱落及坏死、固有层大量充血及出血、固有层大量炎性细胞浸润,与模型组比较,各给药组在胃黏膜上皮细胞脱落坏死、充血出血、炎性细胞浸润病理损伤方面均有改善,

表5 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠胃黏膜肉眼损伤积分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 5 Effects of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on gross damage score of gastric mucosa in mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肉眼损伤积分/分
模型组		32.40±7.38
奥美拉唑组	0.026	29.50±8.09
葛花-枳椇子高剂量组	29.2	15.69±2.59 ⁴⁾
葛花-枳椇子中剂量组	14.6	20.42±3.37 ^{4,5)}
葛花-枳椇子低剂量组	7.3	21.83±4.88 ^{3,5)}
葛花组	19.5	17.25±2.26 ⁴⁾
枳椇子组	19.5	24.85±5.35 ⁶⁾

而葛花-枳椇子高、中、低剂量组病理损伤情况明显好于奥美拉唑及单味葛花和枳椇子组,且葛花-枳椇子高剂量组防治效果最佳;与模型组比较,除枳椇子组外,各给药组病理损伤积分均显著减少($P<0.01$);与葛花-枳椇子高剂量组比较,葛花-枳椇子中、低剂量组、葛花组、枳椇子组病理损伤积分显著增加($P<0.01$);与葛花-枳椇子中剂量组比较,葛花组、枳椇子组病理损伤积分显著增加($P<0.01$);与葛花-枳椇子低剂量组比较,枳椇子组病理损伤积分明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图2、表6。



注:A.空白组;B.模型组;C.奥美拉唑组;D.葛花-枳椇子高剂量组;E.葛花-枳椇子中剂量组;F.葛花-枳椇子低剂量组;G.葛花组;H.枳椇子组(图2同)

图1 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠胃黏膜组织形态的影响

Fig. 1 Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on histomorphology of gastric mucosa in mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury

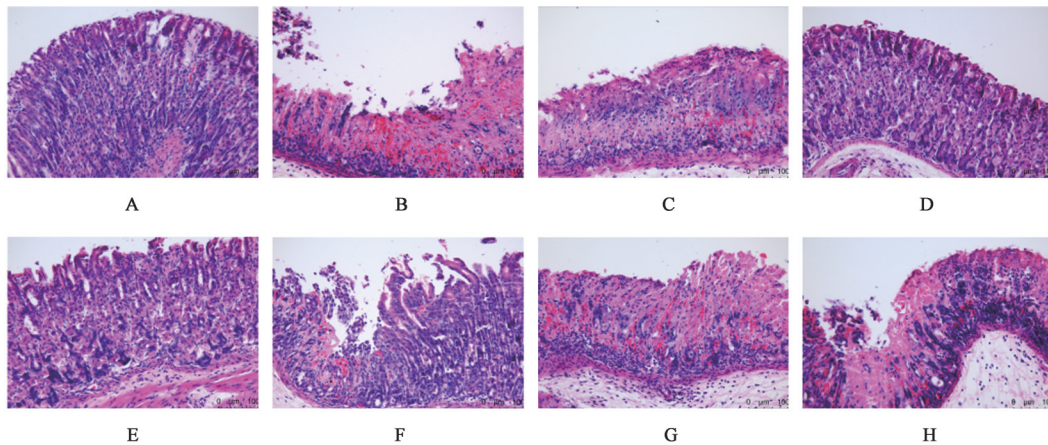


图2 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠胃黏膜组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on histopathology of gastric mucosa in mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury (HE, ×200)

表6 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠病理损伤积分的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 6 Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on pathological damage score of acute alcohol-induced gastric mucosal injury in mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	病理损伤积分/分
模型组		12.43±2.47
奥美拉唑组	0.026	9.00±3.00 ⁴⁾
葛花-枳椇子高剂量组	29.2	5.42±1.08 ⁴⁾
葛花-枳椇子中剂量组	14.6	7.92±1.68 ^{4,6)}
葛花-枳椇子低剂量组	7.3	8.92±1.83 ^{4,6)}
葛花组	19.5	10.17±2.17 ^{4,6,8)}
枳椇子组	19.5	11.20±1.62 ^{6,8,9)}

3.5 对小鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α含量的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中IL-6、IL-1β和TNF-α含量明显升高($P<0.05, P<0.01$),与模型组比较,各给药组血清中IL-6含量明显降低,除葛花组外,其余给药组血清中IL-1β含量明显降低($P<0.05, P<0.01$),葛花-枳椇子高、中剂量组血清中TNF-α含量明显降低($P<0.05, P<0.01$);与葛花-枳椇子高剂量组比较,葛花-枳椇子低剂量组、葛花组、枳椇子组血清中IL-1β含量显著升高($P<0.01$);与葛花-枳椇子中剂量组比较,葛花-枳椇子低剂量组、葛花组、枳椇子组血清中IL-1β含量明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表7。

表7 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α含量的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 7 Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on contents of IL-6, IL-1β and TNF-α in serum of mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	IL-1β	TNF-α
空白组		4.10±3.21	118.75±38.25	835.73±372.30
模型组		9.93±4.05 ²⁾	217.16±18.37 ²⁾	2 786.00±1 070.04 ¹⁾
奥美拉唑组	0.026	5.80±2.09 ⁴⁾	127.08±54.38 ⁴⁾	2 029.33±904.72
葛花-枳椇子高剂量组	29.2	4.90±2.39 ⁴⁾	123.24±32.18 ⁴⁾	911.44±228.34 ³⁾
葛花-枳椇子中剂量组	14.6	5.33±2.17 ⁴⁾	142.97±25.79 ⁴⁾	1 090.84±509.47 ³⁾
葛花-枳椇子低剂量组	7.3	6.81±2.91 ³⁾	182.09±27.03 ^{3,6,7)}	1 130.40±664.14
葛花组	19.5	6.37±2.37 ⁴⁾	206.07±36.41 ^{6,8)}	1 568.75±1247.08
枳椇子组	19.5	6.09±2.62 ⁴⁾	182.79±14.74 ^{3,6,7)}	1 271.57±604.91

3.6 对小鼠胃黏膜组织NF-κB p65、IκBα mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠胃黏膜组织NF-κB p65 mRNA表达量显著升高,IκBα mRNA表达量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠胃黏膜组织NF-κB p65 mRNA表达量明显降

低,除葛花和枳椇子组外,其余各给药组小鼠胃黏膜组织IκBα mRNA表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$);与葛花-枳椇子高剂量组比较,葛花组与枳椇子组小鼠胃黏膜组织IκBα mRNA表达量明显降低($P<0.05$)。见表8。

表8 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠胃黏膜组织NF- κ B p65、I κ B α mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of Flos Puerariae, Hoveniae Semen and their compatibility on expression of NF- κ B p65 and I κ B α mRNA in gastric mucosa of mice with acute alcohol-induced gastric mucosal injury ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF- κ B p65	I κ B α
空白组		0.70±0.26	4.81±1.64
模型组		3.47±2.09 ²⁾	0.70±0.49 ²⁾
奥美拉唑组	0.026	0.96±0.74 ⁴⁾	1.96±0.83 ⁴⁾
葛花-枳椇子高剂量组	29.2	0.90±0.76 ⁴⁾	2.13±0.85 ⁴⁾
葛花-枳椇子中剂量组	14.6	1.30±0.30 ⁴⁾	1.88±0.66 ³⁾
葛花-枳椇子低剂量组	7.3	1.66±1.64 ³⁾	1.81±0.98 ³⁾
葛花组	19.5	1.47±0.38 ³⁾	1.15±0.69 ⁵⁾
枳椇子组	19.5	1.98±1.60 ³⁾	0.98±0.46 ⁵⁾

4 讨论

饮酒后,乙醇首先在胃内滞留,并显著影响胃黏膜的生理功能。而乙醇在体内的代谢主要依靠ADH系统,研究表明,乙醇的清除速率和ADH活力直接相关^[18],而乙醇在ADH系统的代谢作用下,可氧化成乙醛,生成的乙醛经过一系列复杂反应最终氧化分解为水和二氧化碳,最后排出体外^[19],ADH的活性影响体内乙醇的代谢速率,ADH活性降低导致乙醇在体内大量滞留,高浓度乙醇可直接对胃黏膜造成损伤^[20],并且导致严重的醉酒症状。本实验中,与空白组比较,模型组小鼠肉眼观察下,胃黏膜出血、水肿明显,且镜下观察,胃黏膜上皮细胞脱落坏死,固有层充血、出血明显,说明小鼠急性酒精性胃黏膜损伤模型复制成功。

本实验研究发现,葛花、枳椇子及其配伍能够提高急性酒精性胃黏膜损伤小鼠胃黏膜中ADH活性,从而降低血中乙醇浓度,改善小鼠的醉酒症状,起到防醉和醒酒作用,并且能降低乙醇对胃黏膜的直接损伤,肉眼观察发现能减轻小鼠胃黏膜出血、水肿情况,镜下观察发现能够改善小鼠胃黏膜上皮细胞脱落坏死,固有层充血、出血等情况,且实验结果显示葛花枳椇子配伍比葛花、枳椇子单独使用效果更佳,而同等配比中,葛花-枳椇子高剂量组为最佳防治组。

炎症介质是乙醇诱导的急性胃黏膜损伤发病机制中的重要攻击性因素^[21-23],促炎细胞因子,包括IL-6、IL-1 β 和TNF- α ,可引起炎症反应,而NF- κ B是调节炎症反应的重要转录因子,在炎症细胞因子介导的炎症反应中起中心作用^[24]。NF- κ B不仅在扩

大炎症反应中起着重要的调节作用,还可以高效诱导炎症细胞因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)的生成,以上因子产生后又促进NF- κ B的激活,形成正反馈机制,使炎症反应级联放大^[25],而I κ B α 作为NF- κ B信号通路的抑制因子,可以与细胞质中的NF- κ B二聚体(p65、p50)相结合,从而抑制了NF- κ B的核定位信号的活化,使NF- κ B处于一种无活性状态^[26]。当机体响应刺激后,I κ B α 蛋白被磷酸化、泛素化和降解,导致NF- κ B易位进入细胞核,通过结合特定的DNA结合位点来对靶基因进行调节和转录^[27]。

本实验研究发现,葛花、枳椇子及其配伍可以调控NF- κ B信号通路,具体表现为通过增加胃黏膜I κ B α mRNA的表达,从而降低胃黏膜NF- κ B p65 mRNA的表达,进而减少血中炎症因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)的生成,减轻乙醇对胃黏膜的炎症损伤,且葛花-枳椇子比葛花、枳椇子单独使用效果更佳。但是本实验目前只进行了NF- κ B p65、I κ B α mRNA的检测,而NF- κ B p65、I κ B α 蛋白活性通常为磷酸化形式^[20,27],所以NF- κ B p65、I κ B α 蛋白及其磷酸化形式的表达是否和mRNA表达情况相符合,还不得而知,这需要进行进一步的研究探讨。

综上所述,葛花、枳椇子及其配伍能够起到对小鼠急性酒精性胃黏膜损伤的防治作用,能够增加胃黏膜中ADH活性,降低血中乙醇浓度,改善小鼠醉酒状态,降低胃黏膜炎症损伤,这种防治作用机制可能与抑制胃黏膜NF- κ B信号通路的表达,从而减少炎症因子的表达有关,但这还需要进行进一步蛋白层面的验证。本实验发现葛花-枳椇子相比于葛花、枳椇子单独使用,效果更佳,在急性酒精性胃黏膜损伤动物模型上,体现了中药相须配伍理论的本质,且同等配比下,高剂量为最佳保护剂量。酒精不仅对胃有损伤,对机体多脏器皆有损伤^[28],本研究成果在一定程度上阐明了葛花枳椇子“清湿热、解酒毒”保护酒精性胃黏膜损伤的现代科学依据,为进一步开展葛花、枳椇子及其配伍防治酒精致多脏器损伤奠定了基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BARDACH A E, ALCARAZ A O, CIAPPONI A, et al. Alcohol consumption's attributable disease burden and cost-effectiveness of targeted public health interventions: A systematic review of mathematical models[J]. BMC Public Health, 2019, 19(1): 1378.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al.

- Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6) : 394-424.
- [3] 凌佼佼, 栾兰, 杨芳, 等. 葛花总黄酮对链脲佐菌素诱导糖尿病视网膜病变小鼠玻璃体血管内皮生长因子及高迁移率族蛋白B1信号通路的影响[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(7):812-816.
- [4] PARK J Y, MOON J Y, PARK S D, et al. Fruits extracts of *Hovenia dulcis* Thunb. suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses through nuclear factor-kappaB pathway in RAW 264. 7 cells[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(4):357-365.
- [5] WENG L, ZHANG H, LI X, et al. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44:1-8.
- [6] CHOI R Y, WOO M J, HAM J R, et al. Anti-steatotic and anti-inflammatory effects of *Hovenia dulcis* Thunb. extracts in chronic alcohol-fed rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90:393-401.
- [7] 许皖. 葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性肝损伤小鼠保护作用的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2020.
- [8] 李怡文, 刘阳, 柳海艳, 等. 葛花枳椇子配伍使用对醉酒小鼠体内乙醇代谢过程的影响[J]. *世界中医药*, 2017, 12(8):1885-1889.
- [9] 张萌, 朱光建. 酒客乐联合泮托拉唑治疗酒精性胃黏膜损伤的临床疗效观察[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(7):566-569, 574.
- [10] 王胜鹏, 陈美婉, 王一涛. 葛花化学成分和药理活性研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(2):194-197.
- [11] 张敏娜, 张永华. 枳椇云母汤对大鼠肝组织和胃黏膜乙醇脱氢酶活性及血中乙醇浓度的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2012, 22(1):15-16, 55.
- [12] 柳海艳. 葛花枳椇子配伍对酒精性肝损伤的防治作用及机理探讨[D]. 北京:北京中医药大学, 2011.
- [13] 刘明. 葛花枳椇子配伍防治大鼠慢性酒精性肝损伤的量-时-效关系初步研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2015.
- [14] 许皖, 李娜, 柳海艳, 等. 基于Keap1/Nrf2/ARE信号通路探讨葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性肝损伤小鼠抗氧化应激的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(1):37-44.
- [15] 刘明, 陈绍红, 钟赣生, 等. 葛花枳椇子配伍对酒精性肝损伤大鼠血中乙醇浓度和肝中乙醇脱氢酶活性的量-时-效影响[J]. *环球中医药*, 2015(3):299-303.
- [16] 陈自泓, 黄可儿. 黄芪多糖对乙醇诱导的大鼠胃黏膜损伤的修复机制[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(12):2750-2756.
- [17] 高柳芳, 张海燕, 张瑞, 等. 黄芪山药粉对急性酒精性大鼠胃黏膜损伤保护作用的实验研究[J]. *山西中医*, 2022, 38(8):59-61.
- [18] XIAO C, ZHOU F, ZHAO M, et al. Chicken breast muscle hydrolysates ameliorate acute alcohol-induced liver injury in mice through alcohol dehydrogenase (ADH) activation and oxidative stress reduction [J]. *Food Funct*, 2018, 9(2):774-784.
- [19] HOU R, LIU X, YAN J, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice[J]. *Food Funct*, 2019, 10(2):1017-1027.
- [20] 刘彦哲. 人参多糖对大鼠乙醇诱导胃黏膜损伤的保护作用及机制研究[D]. 长春:吉林大学, 2020.
- [21] REN S, CHEN B, MA Z, et al. *Polygonum hydropiper* extract attenuates ethanol-induced gastric damage through antioxidant and anti-inflammatory pathways [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54(8):e10841.
- [22] LI W, WANG X, ZHI W, et al. The gastroprotective effect of nobiletin against ethanol-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress and inflammation [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2017, 39(6):354-363.
- [23] DURAN Y, KARABOĞA İ, POLAT F R, et al. Royal jelly attenuates gastric mucosal injury in a rat ethanol-induced gastric injury model[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(11):8867-8879.
- [24] KUCHARCZAK J, SIMMONS M J, FAN Y, et al. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of *Apoptosis* [J]. *Oncogene*, 2003, 22(56):8961-8982.
- [25] 于锦超, 于敏, 莫炜. NF- κ B信号通路在肿瘤发生和炎症反应中的作用[J]. *药物生物技术*, 2016, 23(1):82-85.
- [26] GHOSH S, HAYDEN M S. New regulators of NF-kappaB in inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(11):837-848.
- [27] JIN B R, CHUNG K S, CHEON S Y, et al. Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS) -induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46252.
- [28] 周可林, 陈绍红. 伤酒导致多脏器损伤的中医研究[J]. *中国社区医师*, 2016, 32(27):14, 16.

[责任编辑 孙丛丛]