

# 醋炙降低甘遂对小鼠胃肠道氧化损伤作用机制研究

高兰, 颜晓静, 李征军, 杨艳菁, 张丽\*, 丁安伟

(南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 南京 210046)

**[摘要]** **目的:**研究醋炙降低甘遂乙酸乙酯部位对小鼠胃肠道氧化损伤的作用机制。**方法:**将小鼠分为空白对照组、甘遂组(256,160,100 g·kg<sup>-1</sup>)、醋甘遂组(256,160,100 g·kg<sup>-1</sup>),灌胃给药 7 d 后,取小鼠胃、肠匀浆测定乳酸脱氢酶(LDH)活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量。取胃、肠组织进行 HE 染色,光镜观察其组织形态学改变。**结果:**空白对照组小鼠体重无明显减轻,大便性状正常,甘遂和醋甘遂各剂量组出现体重明显减轻和大小便失禁,但与甘遂组比较,醋甘遂各剂量组体重减轻较少,泻下作用有所缓和。与空白对照组比较,甘遂各剂量组胃肠 SOD 活力、GSH 含量明显降低,MDA 含量、LDH 活力明显增高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与甘遂组比较,醋甘遂各剂量组胃肠 SOD 活力、GSH 含量明显增高,MDA 含量、LDH 活力明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与空白对照组比较,甘遂各剂量组胃肠黏膜损伤显著加重( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与甘遂组比较,醋甘遂各剂量组胃肠黏膜损伤显著减轻( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**醋炙能明显降低甘遂乙酸乙酯部位对小鼠胃肠道的氧化损伤,为后续进一步探讨甘遂醋炙减毒机制提供了一定的依据。

**[关键词]** 甘遂; 醋炙甘遂; 胃肠损伤; 氧化损伤; 减毒

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0257-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013100257

## Gastrointestinal Toxicity Attenuation of Kansui Radix Stir-baked with Vinegar by Reducing Oxidative Injury in Mice

GAO Lan, YAN Xiao-jing, LI Zheng-jun, YANG Yan-jing, ZHANG Li\*, DING An-wei

(Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the gastrointestinal toxicity of ethyl acetate extract of Kansui Radix (KS) and Kansui Radix stir-baked with vinegar (VKS). **Method:** ICR mice were dosed for 7 days with the ethyl acetate extract of KS (256, 160, 100 g·kg<sup>-1</sup>) and VKS (256, 160, 100 g·kg<sup>-1</sup>), and then were killed to collect the stomach and intestines. Afterwards, the gastrointestinal tissues were sliced and stained with Hematoxylin and Eosin (HE) staining to observe the pathological changes. The activities of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) were measured from gastrointestinal homogenate. **Result:** After treated with KS and VKS, weight of ICR rats was reduced and diarrhea was occurred. However, in comparison with the KS treated groups, the VKS treated groups had less weight loss and lighter diarrhea, while the control group had no weight loss and bowel movement was normal. In comparison with the control group, KS groups had lower SOD activities and GSH content, but higher MDA content and LDH activities ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); in comparison with KS groups, VKS groups had higher SOD activities and GSH content, but lower MDA content and LDH activities ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). HE staining of gastric and intestinal

**[收稿日期]** 20121020(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30973940);国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-09-0163);江苏省“六大人才高峰”项目(2010年度);江苏高校优势学科建设工程项目(yxxk-2010)

**[第一作者]** 高兰, 硕士研究生, 从事中药炮制机制与质量标准研究, Tel: 13809036963, E-mail: gaolan1000@126.com

**[通讯作者]** \*张丽, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药炮制与质量控制研究, Tel: 025-85811519, E-mail: zhangliguanxiong@163.com

tissues showed less gastric mucosa and intestinal mucosa damage in VKS treated groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** Stir-baked processing with vinegar could attenuate the gastrointestinal toxicity of kansui due to reducing the oxidative injury of kansui, which provided significant data for promoting safer and better use of this herb in clinic.

[**Key words**] Kansui Radix; Kansui Radix stir-baked with vinegar; gastrointestinal toxicity; oxidative injury; toxicity attenuation

甘遂始载于《神农本草经》，列为下品，其性苦、寒，有毒，用于水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚、气逆咳喘、二便不利等症<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明，甘遂对口腔、胃肠道及皮肤有严重的刺激性，以及致炎、促发肿瘤等多种毒性<sup>[2-3]</sup>，严重制约了甘遂的临床应用。文献研究表明<sup>[4-6]</sup>，甘遂的刺激性成分主要集中在其乙酸乙酯部位。中医临床历代多采用醋制降低甘遂的毒性和刺激性，缓和泻下作用，但迄今为止，对醋炙降低甘遂乙酸乙酯部位体内胃肠道毒性的作用机制尚缺乏系统研究，本实验采用整体动物模型，考察了甘遂醋炙前后乙酸乙酯部位对小鼠胃肠道氧化损伤影响的差异，以期探讨甘遂醋炙减毒机制提供一定的依据。

## 1 材料

**1.1 试剂** 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号 20110625)、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(批号 20110626)、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号 20110618)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20110620)、谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(批号 20110622)，以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

**1.2 仪器** DK-S22 型电热恒温水浴箱(上海精宏实验设备有限公司)，全自动酶标仪(美国 Bio-Red 公司)，powerwave X340 全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)，TGL 6M 高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)，WH-90A 微型漩涡混悬器(上海振荣科学仪器有限公司)。

**1.3 药物** 甘遂采自陕西宝鸡县赤沙乡，经南京中医药大学王春根教授鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的块根。

**1.4 动物** ICR 小鼠，雌雄各半，体重(20 ± 2)g，由扬州大学比较医学中心提供，动物许可证号 SCXK(苏)20070001。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 将 70 只 ICR 小鼠置于室温、通风的清洁级动物室中，自由摄食饮水，适应 3 d 后，按体重、性别随机分为 7 组，每组 10 只，即空白对照组，甘遂乙酸乙酯部位高、中、低剂量组(简称甘遂

高、中、低剂量组)；醋甘遂乙酸乙酯部位高、中、低剂量组(简称醋甘遂高、中、低剂量组)。

甘遂生品：取大小分档后的净甘遂 2.5 kg 打粉备用(打粉得率为 99.9%)；甘遂醋炙品：取大小分档后的净甘遂 2.5 kg 置不锈钢容器中，用米醋 750 g 拌匀，闷透，待醋被充分吸尽后，置已加热到 260 ℃ 的炒锅中，不断翻炒至颜色加深略有焦斑时，取出，放凉，打粉备用(得率为 99.8%)。

将甘遂和醋甘遂粗粉(过 24 目筛)，加 95% 乙醇 50 ℃ 温浸 5 次至温浸液近无色，合并温浸液，50 ℃ 减压回收溶剂至近干，浸膏分别加 0.104 kg 和 0.130 kg 硅藻土拌样，加适量乙酸乙酯，采用磁力搅拌器搅拌 5 次，至乙酸乙酯萃取液近无色，合并萃取液，50 ℃ 减压回收溶剂至干(甘遂乙酸乙酯部位得率 19.7%，醋甘遂乙酸乙酯部位得率 18.9%)。临用前，用 0.5% CMC-Na 溶液分别配成所需浓度。

甘遂和醋甘遂高、中、低剂量组分别给予相当于生药量 256, 160, 100 g·kg<sup>-1</sup> 的乙酸乙酯提取物溶液，空白对照组给予等体积 0.5% CMC-Na 溶液，均为 20 mL·kg<sup>-1</sup>，灌胃，1 次/d，连续 7 d，末次药后 1 h 脱颈椎处死小鼠，取胃肠组织制成 10% 组织匀浆，以 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 后取上清液，-20 ℃ 冻存，待测 SOD, MDA, LDH, GSH。

**2.2 一般情况观察** 逐只记录观察体重、进食、尿液、粪便、活动和死亡等情况，每天进行体重、日食量、日水量的变化观察。

**2.3 对胃肠组织中氧化损伤指标的影响** 取各组小鼠 2% 胃、2% 肠匀浆，按试剂盒方法测定胃肠组织 SOD 活性；取 10% 胃、10% 肠匀浆，按试剂盒方法测定胃肠组织中 MDA 含量和 GSH 含量；取 2% 胃、1% 肠匀浆，按试剂盒方法测定胃肠组织 LDH 活力；取 1% 胃、1% 肠匀浆，按考马斯亮蓝蛋白试剂盒方法测定胃肠组织中蛋白含量。

**2.4 对胃肠组织形态学的影响** 取一部分胃肠组织，用 4% 中性多聚甲醛固定，常规制片，HE 染色，光镜下观察其组织形态学改变。

病理切片评分 显微镜下观察胃组织学改变，

按黏膜层损伤深度及损伤占黏膜层的面积评分<sup>[8]</sup>:损伤深度≤1/3记1分,1/3<损伤深度<2/3计2分,损伤深度≥2/3计3分,1%≤损伤面积<30%计1分,30%≤损伤面积<60%计2分,60%≤损伤面积<90%计3分,90%≤损伤面积计4分;将损伤深度评分与损伤面积评分相乘,即得此小鼠胃黏膜损伤指数。

HE染色切片显微镜下观察小肠组织学改变,主要对小肠组织炎症轻重、病变深度、隐窝及上皮破坏情况进行评价。小肠黏膜损伤分为6度。0度为正常黏膜绒毛结构;1度为肠黏膜绒毛顶端上皮间隙增宽;2度为绒毛上皮间隙进一步扩大,绒毛尖端上皮抬高与固有膜分离;3度为绒毛两边上皮成块脱落;4度为绒毛上皮完全脱落,仅存固有膜结构;5度为肠黏膜固有膜崩解,出现出血和溃疡。

**2.5 统计学方法** 采用SPSS 17.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两间

比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对一般情况的观察比较** 空白对照组活动较多,动作敏捷,食量正常,体重无明显减轻,大便呈颗粒状;甘遂各剂量组小鼠逐渐出现烦躁、耸毛、发抖、蜷缩、抽搐、大小便失禁等症状,个别小鼠死亡,其中甘遂高剂量组死亡2只。与甘遂组比较,醋甘遂各剂量组个别小鼠出现大小便失禁症状,体重减轻较少,醋甘遂高剂量组死亡1只。

**3.2 对胃肠组织抗氧化指标的影响** 与空白对照组相比,甘遂各剂量组小鼠胃、肠组织中LDH活力、MDA含量明显增高,SOD活力、GSH含量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与甘遂组相比,醋甘遂各剂量组小鼠胃、肠组织中LDH活力、MDA含量明显降低,SOD活力、GSH含量明显增高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),提示醋炙能降低甘遂对胃肠组织的氧化损伤。见表1,2。

表1 甘遂醋炙前后对胃匀浆GSH,LDH,MDA,SOD水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GSH/U·mg <sup>-1</sup>	LDH/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>
空白对照	0	9.513 ± 0.468	70.320 ± 16.593	0.089 ± 0.098	110.178 ± 2.356
甘遂	256	0.880 ± 0.613 <sup>2)</sup>	1 010.793 ± 105.819 <sup>2)</sup>	2.532 ± 0.170 <sup>2)</sup>	51.825 ± 0.843 <sup>2)</sup>
	160	4.395 ± 0.463 <sup>2)</sup>	748.364 ± 39.374 <sup>2)</sup>	0.919 ± 0.053 <sup>2)</sup>	51.608 ± 1.761 <sup>2)</sup>
	100	4.755 ± 0.402 <sup>2)</sup>	300.083 ± 34.522 <sup>2)</sup>	0.654 ± 0.127 <sup>2)</sup>	88.417 ± 5.078 <sup>2)</sup>
醋甘遂	256	5.777 ± 0.367 <sup>2,4)</sup>	242.865 ± 91.079 <sup>2,4)</sup>	0.508 ± 0.250 <sup>2,4)</sup>	81.935 ± 2.877 <sup>2,4)</sup>
	160	8.549 ± 0.332 <sup>2,4)</sup>	65.574 ± 8.127 <sup>4)</sup>	0.397 ± 0.145 <sup>2,4)</sup>	88.091 ± 1.309 <sup>2,4)</sup>
	100	9.704 ± 0.248 <sup>4)</sup>	44.885 ± 17.703 <sup>4)</sup>	0.147 ± 0.136 <sup>4)</sup>	101.489 ± 0.681 <sup>2,4)</sup>

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与等剂量甘遂组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表2~3同)。

表2 甘遂醋炙前后对肠匀浆GSH,LDH,MDA,SOD水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

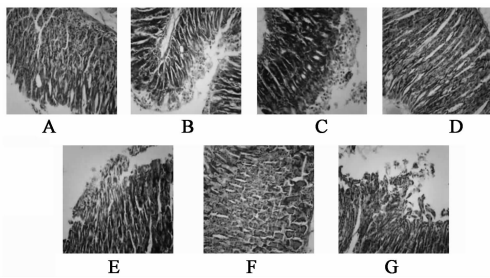
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GSH/U·mg <sup>-1</sup>	LDH/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>
空白对照	0	11.089 ± 0.325	1 097.736 ± 126.680	0.340 ± 0.148	99.618 ± 5.472
甘遂	256	3.058 ± 0.836 <sup>2)</sup>	7 049.058 ± 61.783 <sup>2)</sup>	1.520 ± 0.096 <sup>2)</sup>	55.624 ± 1.380 <sup>2)</sup>
	160	7.830 ± 0.935 <sup>2)</sup>	5 728.801 ± 144.685 <sup>2)</sup>	0.959 ± 0.051 <sup>2)</sup>	72.378 ± 0.578 <sup>2)</sup>
	100	7.560 ± 0.689 <sup>2)</sup>	3 771.916 ± 100.408 <sup>2)</sup>	0.792 ± 0.128 <sup>2)</sup>	85.641 ± 2.168 <sup>2)</sup>
醋甘遂	256	4.184 ± 0.636 <sup>2,4)</sup>	5 998.404 ± 195.249 <sup>2,4)</sup>	1.165 ± 0.139 <sup>2,4)</sup>	65.919 ± 1.922 <sup>2,4)</sup>
	160	8.474 ± 1.548 <sup>2,4)</sup>	3 506.866 ± 124.949 <sup>2,4)</sup>	0.419 ± 0.117 <sup>2,4)</sup>	86.093 ± 1.091 <sup>2,4)</sup>
	100	10.211 ± 0.380 <sup>2,4)</sup>	1 175.212 ± 73.932 <sup>2,4)</sup>	0.170 ± 0.133 <sup>2,4)</sup>	91.549 ± 1.620 <sup>2,4)</sup>

**3.3 对胃肠组织形态学的影响** 空白对照组小鼠胃黏膜上皮结构完整,黏膜表面的胃小凹清晰可见,黏膜内的腺体排列紧密,固有腺体及黏膜层毛细血管无扩张瘀血;甘遂组损伤较深,面积较大,胃小凹结构破坏,胃上皮细胞糜烂、脱落,腺体结构紊乱;醋甘遂组与甘遂组比,损伤面积与深度有不同程度减轻( $P < 0.05$ )。空白对照组小肠黏膜无损伤;甘遂组小肠黏膜固有层可见少量炎细胞浸润和绒毛间隙增宽,血管充血,灶性区域黏膜糜烂;醋甘遂组与甘遂组相比,损伤有不同程度的减轻( $P < 0.05, P <$

$0.01$ )。见图1,2及表3。

表3 甘遂和醋甘遂对胃肠黏膜损伤的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	胃黏膜损伤/分	肠黏膜损伤/度
空白对照	0	0	0
甘遂	256	7.833 ± 2.401 <sup>2)</sup>	1.833 ± 0.408 <sup>2)</sup>
	160	3.667 ± 1.366 <sup>2)</sup>	1.500 ± 0.548 <sup>2)</sup>
	100	1.667 ± 0.816 <sup>2)</sup>	0.333 ± 0.516
醋甘遂	256	4.667 ± 2.503 <sup>3)</sup>	0.833 ± 0.983 <sup>2,3)</sup>
	160	2.167 ± 0.169 <sup>2,3)</sup>	0.500 ± 0.837 <sup>4)</sup>
	100	1.333 ± 0.516 <sup>2,3)</sup>	0.167 ± 0.408



A. 空白对照组; B. 甘遂 256 g·kg<sup>-1</sup>组;  
C. 甘遂 160 g·kg<sup>-1</sup>组; D. 甘遂 100 g·kg<sup>-1</sup>组;  
E. 醋甘遂 256 g·kg<sup>-1</sup>组; F. 醋甘遂 160 g·kg<sup>-1</sup>组;  
G. 醋甘遂 100 g·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1 甘遂醋炙前后对胃组织形态学的影响(HE 染色, ×100)

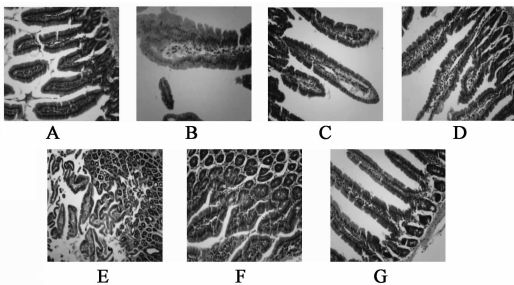


图 2 甘遂醋炙前后对小肠组织形态学的影响(HE 染色, ×100)

#### 4 讨论

现代毒理学认为,引起胃肠道损伤的原因主要有缺血缺氧、缺血-再灌注、氧化损伤、炎症介质、内毒素、营养障碍、微生态平衡失调、胃肠道黏膜免疫功能受损等<sup>[7-8]</sup>,上述各方面既相对独立又相互关联。自由基是引起自身结构和功能的破坏和远处器官组织继发损伤最重要的损伤因素之一<sup>[9]</sup>,胃肠黏膜损伤,会产生并释放大量的自由基,它通过与细胞膜上的多不饱和脂肪酸反应,发生脂质过氧化,损伤细胞膜,破坏膜结构的通透性与完整性<sup>[10]</sup>,从而引起胃肠道损伤,因此,目前认为氧化损伤是造成胃肠道损伤的重要原因之一。氧自由基损伤引起的主要变化为丙二醛(MDA)含量、乳酸脱氢酶(LDH)活力升高、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)含量下降<sup>[11]</sup>。

本研究结果表明,与空白对照组比较,甘遂各剂量组对小鼠胃肠道具有明显的氧化损伤作用,其胃肠道毒性可能途径为:①使胃肠道组织内 SOD 活性下降,造成大量自由基在机体内存积,破坏胃肠道内氧化系统与抗氧化系统的平衡,最终导致胃肠道损伤;②使胃肠道组织内 GSH 含量下降,自身抗氧化能力下降,导致脂质过氧化;③使胃肠道组织内 LDH,MDA 含量增加,线粒体氧化磷酸化功能受损,

自由基生成过多,造成胃肠道不可逆的损伤。醋甘遂各剂量组对胃肠道的氧化损伤显著低于甘遂各组,其机制可能为通过提高 SOD 酶的活力和自身抗氧化能力,减少自由基在机体内的存积,降低线粒体氧化磷酸化功能受损程度,从而减少氧化损伤的程度。

甘遂因其对胃肠道有明显毒性,容易引起肠黏膜屏障的功能障碍而严重制约着临床用药安全,也为新药创制带来了困难。本实验结果表明,甘遂醋炙后,其乙酸乙酯部位可明显降低对小鼠胃肠道的氧化损伤,为后续结合物质基础研究进一步从分子水平探讨甘遂醋炙减毒机制提供了一定的依据。

#### [参考文献]

- [1] 权宜淑. 中国甘遂的草本调查[J]. 西北药学杂志, 1994, 12(9): 255.
- [2] 郑维发. 甘遂醇提物中 4 种二萜类化合物的体内抗病毒活性研究[J]. 中草药, 2004, 35(1): 65.
- [3] 郑维发, 陈才法, 朱爱华, 等. 甘遂醇提物抗流感病毒 FM1 有效部位的筛选[J]. 中成药, 2002, 24(5): 362.
- [4] 耿婷, 黄海燕, 丁安伟, 等. 甘遂炮制前后各部位刺激性和泻下作用研究[J]. 中南药学, 2008, 6(4): 385.
- [5] 颜晓静, 张丽, 丁安伟, 等. 醋制降低甘遂对人正常肝细胞 LO2 毒性研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1667.
- [6] 颜晓静, 李璘, 张丽, 等. 甘遂醋炙前后对脾淋巴细胞活力和腹腔巨噬细胞释放 NO 的量效关系比较研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 629.
- [7] 孙雪链, 黄可儿, 王淑英, 等. 黄芪皂苷类不同有效组分对大鼠急性胃黏膜损伤的保护作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1181.
- [8] 高金生, 杨书良. 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(15): 1540.
- [9] 周爱国, 李小兰. 枸杞多糖对大鼠小肠缺血再灌注氧化应激的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 221.
- [10] 范丽, 郭岩, 马传庚. 黄蜀葵花总黄酮保护离体大鼠心肌缺血再灌注损伤的研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 191.
- [11] 杨惠玲. 高级病理生理学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 24.

[责任编辑 李玉洁]