

柴胡皂苷对无水乙醇致胃黏膜损伤的保护作用

王帅, 包永睿, 孟宪生*, 杨欣欣

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:**研究柴胡皂苷对大鼠无水乙醇致胃黏膜损伤的保护作用及其机制。**方法:**将大鼠分成对照组、模型组、柴胡皂苷组($0.047 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和奥美拉唑组($0.012 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。给药 2 周后,采用无水乙醇灌胃建立大鼠胃黏膜损伤模型,以溃疡指数、病理损伤程度评价柴胡皂苷对胃黏膜的保护作用;采用酶联免疫法,测定无水乙醇致胃黏膜损伤大鼠血清中前列腺素 E_2 (PGE_2)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA),探讨柴胡皂苷的胃黏膜保护作用机制。**结果:**柴胡皂苷给药组溃疡指数明显低于模型组($P < 0.01$);组织病理学积分判定结果,柴胡皂苷组与模型组比较有统计学差异($P < 0.05$);血清 PGE_2 明显高于模型组($P < 0.01$),SOD 明显高于模型组($P < 0.01$),MDA 明显低于模型组($P < 0.01$)。**结论:**柴胡皂苷具有明显的胃黏膜损伤保护作用,可能与抑制胃酸分泌及抗自由基损伤有关。

[关键词] 柴胡皂苷; 胃黏膜损伤; 前列腺素 E_2 ; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0191-04

[doi] 10.11653/syjf2013080191

Protective Effect of Saponins from Bupleurum Chinense on Ethanol-induced Gastric Lesion

WANG Shuai, BAO Yong-rui, MENG Xian-sheng*, YANG Xin-xin

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** This study was aimed at investigating the effects and mechanism of saponins from bupleurum chinense on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Method:** The rats were divided into control group, model group, bupleurum chinense saponins group ($0.047 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and omeprazole group ($0.012 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) respectively. After two weeks treatment, the experimental gastric damages were established by intragastric ethanol. The protective effects of bupleurum chinense saponins were evaluated by calculating lesion indices and observing pathological changes; meanwhile, the contents prostaglandin E_2 (PGE_2), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in serum were measured with euzymelinked immunosorbent assay to determine the protecting mechanism. **Result:** The lesion indices of bupleurum chinense saponins group were significantly lower than the model group ($P < 0.01$). There was no damage was detected in most of rats in treatment group except for small damages in a few rats, and the integral between bupleurum chinense saponins and treatment groups showed statistical differences ($P < 0.05$). The contents of PGE_2 , SOD in serum of bupleurum chinense saponins group were higher while MDA was lower than the model group (all $P < 0.01$). **Conclusion:** bupleurum chinense saponins show obvious protective effect on gastric mucosa damage, and its mechanism may be through restraining the gastric mucosa acid secretion and counteracting the injury of free radical.

[Key words] bupleurum chinense saponins; gastric mucosal injury; PGE_2 ; SOD; MDA

[收稿日期] 20120823(009)

[基金项目] 国家科技部“十一五”计划科技重大专项(2010ZX09401-304-201)

[第一作者] 王帅, 生药学硕士, 助理实验师, 从事药物分析工作, Tel: 0411-87406496, E-mail: christina8673028@126.com

[通讯作者] *孟宪生, 生药学博士, 教授, 从事中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析工作, Tel: 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com

柴胡为伞形科植物北柴胡或狭叶柴胡的干燥根,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功效。柴胡中主要成分为柴胡皂苷,同时还含有植物甾醇、侧金盏花醇,以及少量挥发油、多糖等成分。文献报道柴胡皂苷具有抗炎、抗过敏、抗溃疡、抗病毒、抗肿瘤、调节内分泌及免疫系统等作用^[1-2]。柴胡舒肝散、柴胡桂枝汤、大柴胡汤、小柴胡汤、柴胡丹参饮、健胃愈疡颗粒、平肝健胃冲剂等含柴胡的中药复方,均有不同程度治疗消化系统疾病的作用,相关临床应用报道较多^[3-5]。本文就柴胡皂苷类成分对胃黏膜保护作用进行深入研究,旨在阐明药物作用机制,为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,雌性,由大连医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(辽)2008-0002。动物饲养室温(20 ± 2) °C,相对湿度 50% ~ 60%,颗粒饲料喂养,自由饮水。

1.2 药物与试剂 柴胡,辽宁本溪三药有限公司提供,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为 *Bupleurum chiueuse* DC.,柴胡皂苷(实验室自制,总皂苷含量 70% 以上);奥美拉唑肠溶胶囊(哈药集团三精制药诺捷有限责任公司,批号 100430327),前列腺素 E₂ 试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号 20100719);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,美国 R&D 公司,批号 20100719),丙二醛(MDA)试剂盒,美国 R&D 公司,批号 20100719;其他化学试剂均为分析纯。

1.3 仪器 N137 型数码照相机(伊士曼柯达公司),Leica TP1020 型脱水机(上海徕卡仪器有限公司),BX50-32E 型生物显微镜(日本 Olympus),HC-2517 型高速离心机(科大创新股份有限公司),Milli-Q 型超纯水处理装置(美国 Millipore 公司),恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),SUNRISE 酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

2 方法

2.1 分组、给药及造模方法 按完全随机设计法将 40 只大鼠分成 4 组,每组 10 只,分别为空白组、模型组、柴胡皂苷组(0.047 g·kg⁻¹)、奥美拉唑组(0.012 g·kg⁻¹)。采用无水乙醇灌胃的方法建立胃黏膜损伤动物模型,除空白组 10 只外,其余 30 只大鼠乙醇灌胃,1 次/d,空白、模型组灌服蒸馏水,连续 15 d。从第 14 天开始禁食不禁水 24 h,末次给药 1 h 后,除空白组外,其余均灌胃无水乙醇 1 mL/只^[6]。

2.2 动物处理及标本采集 大鼠灌胃无水乙醇 1 h 后,眼球后静脉丛采血,分离血清留作试剂盒检测;脱颈椎处死大鼠,结扎胃贲门和幽门,并经胃壁向胃腔内注入中性福尔马林溶液 5 mL,将胃取出,放入中性福尔马林溶液中固定 15 min,沿胃大弯剪开胃壁,测量各组溃疡指数,同时计算溃疡抑制百分率,比较各组间差异并拍照;拍照后,将胃放回中性福尔马林溶液中,继续固定,24 h 后,剪取胃窦部及其附近组织,留作组织病理学观察^[7-8]。

2.3 溃疡指数计算 采用传统方法与灰度图像分析 2 种方法分别进行评价,以权重系数 1:1 综合评分计算溃疡指数。①传统方法:将在福尔马林中固定好的胃组织取出,展平,直尺测量溃疡损伤长度:胃黏膜层条索状损伤的长度 < 1 mm 者测量其长度,每 1 mm 计 1 分,若宽度超过 1 mm 者计分加倍,计分总数为该动物的溃疡指数^[8]。②灰度图像分析法:利用 Image J 图像分析软件结合数码相机图像采集技术,按文献[9]中灰度图像分析方法进行评价。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{给药组溃疡指数} / \text{模型组溃疡指数}) \times 100\%$$

2.4 胃组织病理学观察 胃组织按常规方法制片 HE 染色,在光学显微镜下观察胃黏膜损伤情况^[10],损伤程度进行积分判定:正常 0 分;表层上皮损伤 1 分;上层黏膜充血或水肿 2 分;中或下层黏膜充血、水肿或出血 3 分;黏膜上层腺体结构紊乱或坏死 4 分;有深层的坏死或溃疡 5 分。

2.5 对大鼠血清 PGE₂, SOD, MDA 水平的影响 按照试剂盒说明书,采用 ELISA 法检测^[11-12]。

2.6 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,采用完全随机设计成组资料的方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 胃黏膜肉眼观察 空白组大鼠胃黏膜呈粉红色,有光泽。模型组大鼠胃壁色泽苍白,胃窦部黏膜可见程度不同的点状或灶状糜烂。柴胡皂苷、奥美拉唑组大鼠胃黏膜大部分有光泽,仅有少量点状糜烂,明显优于模型组。

3.2 溃疡指数计算 综合评分结果显示,柴胡皂苷、奥美拉唑组动物的溃疡指数与模型组比较明显减少,抑制率较高,结果具有显著差异($P < 0.01$),柴胡皂苷组的抑制作用几乎与奥美拉唑效果一致。见表 1。

表1 柴胡皂苷对大鼠无水乙醇致胃黏膜损伤模型溃疡指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

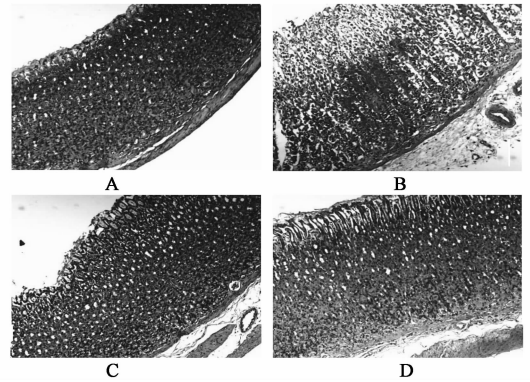
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	传统评价		灰度图像分析	
		溃疡指数/mm	抑制率/%	溃疡指数/mm	抑制率/%
对照	-	0	-	0	-
模型	-	58.65 ± 16.00	-	8.89 ± 3.16	-
柴胡皂苷	0.047	12.32 ± 7.01	78.99 ¹⁾	1.19 ± 0.45	86.62 ¹⁾
奥美拉唑	0.012	11.69 ± 5.25	80.07 ¹⁾	2.14 ± 0.98	86.11 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.3 组织病理学观察结果 光学显微镜下观察,空白组胃黏膜结构层次清楚,腺体排列整齐;模型组病理损伤较重,表层上皮基本损伤,上、中、下层黏膜充血,可见大量红细胞聚集,黏膜上层腺体结构紊乱或坏死,腺腔内较多脱落的上皮细胞碎片;柴胡皂苷、奥美拉唑组多数无损伤,少数病理损伤较轻。胃黏膜损伤积分判定显示模型组积分均值为9.0,柴胡皂苷组为1.5,奥美拉唑组为2.9($n = 10$),治疗组与模型组比较均具有统计学差异($P < 0.05$)。见图1。

3.4 对大鼠血清 PGE₂, SOD, MDA 水平的影响 柴胡皂苷、奥美拉唑组血清 PGE₂ 含量均高于模型组($P < 0.01$),其中奥美拉唑组含量接近空白组,与之比较无显著性差异;柴胡皂苷、奥美拉唑组血清 SOD 活性均高于模型组($P < 0.01$),柴胡皂

苷、奥美拉唑组血清 MDA 含量均显著低于模型组($P < 0.01$),见表2。



A. 对照组; B. 模型组;

C. 柴胡皂苷 0.047 g·kg⁻¹组; D. 奥美拉唑 0.012 g·kg⁻¹组

图1 柴胡皂苷对大鼠胃黏膜病理损伤的影响(HE染色, ×40)

表2 柴胡皂苷对胃溃疡模型大鼠血清 PGE₂, SOD, MDA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PGE ₂	SOD	MDA
		/μg·L ⁻¹	/U·L ⁻¹	/mol·L ⁻¹
对照	-	29.28 ± 1.09	134.52 ± 2.22	62.11 ± 3.92
模型	-	15.44 ± 1.85	91.94 ± 2.50	87.80 ± 3.30
柴胡皂苷	0.047	20.55 ± 1.47 ¹⁾	114.47 ± 4.86 ¹⁾	73.58 ± 3.13 ¹⁾
奥美拉唑	0.012	28.83 ± 1.16 ¹⁾	113.30 ± 2.34 ¹⁾	68.90 ± 2.92 ¹⁾

4 讨论

本实验分别采用传统方法和灰度图像分析二种方法评价溃疡指数,进行综合评分;组织病理学观察时,也分别采用光镜直接观察与统计学积分判定二种方法进行评价,使实验结果更具科学性、可靠性。从胃黏膜肉眼观察、溃疡指数计算及组织病理学观察结果来看,柴胡皂苷组均表现出较好的胃黏膜损伤保护作用,且保护效果与临床公认的治疗胃溃疡效果较好的阳性对照药奥美拉唑极为相近。

造模后,模型组体内内源性保护因子 PGE₂ 水平与空白组比较明显减少;柴胡皂苷组胃黏膜表面上皮细胞及胃壁细胞内 PGE₂ 水平明显增加。推测其作用机制可能为 PGE₂ 含量增加,激活蛋白激酶 C,催化 H₂ 受体磷酸化,从而减弱 H₂ 受体与组胺的

亲和力,使组胺含量降低,诱导腺苷酸环化酶活性降低;同时 PGE₂ 可直接抑制腺苷酸环化酶的亚基磷酸化,使腺苷酸环化酶活性下降,进而使 cAMP 生成减少,导致胃壁细胞酸分泌减少,胃壁细胞功能受抑制,起到抑制胃酸分泌的作用。同时,黏膜中内源性前列腺素生成的增加,可刺激碳酸氢根离子和黏液的分泌,使黏液层厚度增加,形成薄膜样层覆盖在上皮表面,直接保护胃黏膜。

另外,目前认为氧自由基是许多致病因子所致的急性胃黏膜损害的物质,机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并由此形成脂质过氧化物。不同因素所造成的胃酸增高或应激性胃黏膜缺血,不仅可致胃黏膜局部出现一系列炎症反

左旋多巴甲酯对剥夺性弱视猫视网膜 c-fos 表达的影响

梁韬,黎荣,林兴,张士军,蒋伟哲,黄仁彬*

(广西医科大学药学院,南宁 530021)

[摘要] 目的:研究左旋多巴甲酯(LDME)对剥夺性弱视猫视网膜细胞凋亡情况以及 c-fos 表达及其分布的特点,并探讨其作用机制。方法:健康 2 周龄幼猫 30 只随机分成 6 组:模型对照组及正常对照组,左旋多巴阳性对照组,LDME 低、中、高剂量组,每组 5 只。除了正常组,各组幼猫于 4 周龄时单纯缝合左眼建立剥夺性弱视,12 周后打开缝合眼并开始给药,每天灌胃 LDME 20,40,80 mg·kg⁻¹,阳性组为左旋多巴 40 mg·kg⁻¹,正常组与模型组为等量生理盐水,持续 30 d。TUNEL 法检测视网膜细胞的凋亡情况,经原位杂交技术、免疫组化检测视网膜中 c-fos mRNA 和 c-fos 蛋白的表达。结果:与模型对照组比较,LDME 明显减少弱视猫视网膜组织的细胞凋亡指数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显著上调 c-fos mRNA 在视网膜中的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),同时增加 c-fos 免疫阳性细胞数量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:左旋多巴甲酯有效地保护剥夺性弱视造成的视网膜损伤,其机制可能与抑制细胞凋亡以及促进 c-fos 表达有关。

[关键词] 左旋多巴甲酯;剥夺性弱视;视网膜;细胞凋亡;c-fos;猫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0194-04

[doi] 10.11653/syfy2013080194

[收稿日期] 20121011(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30760285);广西研究生教育创新计划项目(2011105981002M173)

[第一作者] 梁韬,硕士生,从事抗弱视药和生化药理学研究,Tel: 13481000982,E-mail:303991542@qq.com

[通讯作者] * 黄仁彬 博士,教授,博士生导师,从事抗弱视药和生化药理学研究,Tel:0771-5339805,E-mail: huangrenbin518@163.com

应,而且炎症过程中可产生大量的 O²⁻,O²⁻可引起细胞器单位膜脂质过氧化,使 MDA 明显增高,并进而导致细胞的毒性反应,加重溃疡的形成。本研究发现柴胡皂苷可显著提高胃黏膜损伤大鼠血清 SOD 水平,降低 MDA 水平,推测其另一保护胃黏膜机制可能与抗氧自由基损伤有关。

[参考文献]

[1] 谢东浩,蔡宝昌,安益强,等.柴胡皂苷类化学成分及药理作用研究进展[J].南京中医药大学学报:自然科学版,2007,23(1):63.
[2] 刘云海,陈永顺,谢委,等.柴胡总皂苷抗内毒素活性研究[J].中药材,2003,26(6):423.
[3] 郑建伟,许丹娜.不同制备方法配制的小柴胡汤药效比较研究[J].中药材,2007,30(6):708.
[4] 孙海龙,孙运海,孙运群,等.柴胡舒肝散加味治疗胃十二指肠球部溃疡 54 例临床观察[J].中医药学报,2008,36(5):59.
[5] 李长安.柴胡桂枝汤加减治疗功能性消化不良 40 例[J].实用中医内科杂志,2011,25(6):68.
[6] 仇亚男,沈明勤,林剑军,等.平胃舒胶囊对大鼠胃黏

膜损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):203.

[7] 李备,潘永全,刘华蓉,等.黄连总碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用及其机制研究[J].中成药,2006,28(1):72.
[8] 江涛,唐春萍,陈艳芬,等.高良姜总黄酮对大鼠实验性胃溃疡模型的影响[J].中药材,2009,32(2):260.
[9] Wang Shuai, Bao Yong-rui, Diao Yun-Peng, et al. Evaluation of gastric ulcer model based on gray-scale image analysis [J]. Afr J Biotechnol, 2011, 5(11):1285.
[10] 舒劲,李喜香,吴国泰,等.制萎扶胃浓缩丸对 CAG 模型大鼠胃分泌功能和胃黏膜组织形态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):173.
[11] 刘男,张颖丽,张善玉,等.朝药关苍术提取物对无水乙醇致小鼠胃黏膜损伤的影响[J].中国民族医药杂志,2010,16(3):41.
[12] 赵红晔,曹军,王月飞,等.溃疡平对乙酸性胃溃疡大鼠胃黏膜血流量及血清 ET-1,NO 含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):213.

[责任编辑 李玉洁]