

黄芪皂苷对大鼠萎缩性胃炎的治疗作用 及对 MyD88, TLR4 受体的影响

张莲, 周语平*, 刘光炜
(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**观察黄芪皂苷对萎缩性胃炎(CAG)大鼠的治疗作用,以及对髓样分化因子(MyD88),Toll样受体4(TLR4)受体的影响。**方法:**采用综合法造模,建立大鼠萎缩性胃炎模型,造模成功后,分别用生理盐水、黄芪皂苷(14.93 mg·kg⁻¹)和硫糖铝(360 mg·kg⁻¹)ig。在ig的10周、15周时分别处死大鼠,取大鼠全胃,取材、切片,HE染色,固定切片后,显微镜下观察有无肠上皮化生、假性幽门腺化生、不典型增生的发生情况,检测不同组别大鼠各期的胃组织中的MyD88,TLR4的表达,比较各组间MyD88,TLR4表达的差异,并检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性,研究黄芪皂苷对萎缩性胃炎大鼠的治疗作用。**结果:**黄芪皂苷对萎缩性胃炎大鼠具有治疗作用,黄芪皂苷治疗后,肠上皮化生、假性幽门腺化生、不典型增生的发生情况明显减少,同时MyD88,TLR4的表达较空白组、硫糖铝组明显降低,而SOD活性的表达以黄芪皂苷组较高,与空白组相近,其次为硫糖铝组。**结论:**黄芪皂苷可以阻止MyD88,TLR4受体的激活,提高SOD活性,对于萎缩性胃炎具有治疗作用。

[关键词] 黄芪皂苷;慢性萎缩性胃炎;Toll样受体4;髓样分化因子88

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0226-04

Therapeutic Effects of Astragalus Saponin on Rats with Atrophic Gastritis and MyD88, TLR4 Receptor

ZHANG Lian, ZHOU Yu-ping*, LIU Guang-wei
(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effects of astragalus saponin on rats with atrophic gastritis (CAG), and on myeloid differentiation factor 88 (MyD88), Toll-like receptor 4 (TLR4) receptor. **Method:** The rat model of atrophic gastritis was established with synthesis method. Then saline, astragalus saponin (14.93 mg·kg⁻¹) and sucralfate (360 mg·kg⁻¹) were given orally after the modeling rats were sacrificed after 10 weeks and 15 weeks, and whole stomach was collected to observe whether there were intestinal metaplasia, pseudo-pyloric metaplasia, atypical hyperplasia under the microscope, the expression of MyD88 and TLR4 was detected. **Result:** Astragalus saponin had a therapeutic effect on rats with atrophic gastritis, the occurrence of intestinal metaplasia, pseudo-pyloric metaplasia, atypical hyperplasia significantly reduced, at the same time, the expression of TLR4 and MyD88 decreased significantly compared with blank group and sucralfate group, higher expression of superoxide dismutase (SOD) activity in astragalus saponin group was found. **Conclusion:** Astragalus saponin can prevent the activation of MyD88, TLR4 receptors and improve the activity of SOD, it has a therapeutic effect on atrophic gastritis.

[Key words] astragalus saponin; CAG; TLR4; MyD88

萎缩性胃炎(CAG)是临床上常见的慢性消化 系统疾病,以胃黏膜上皮和腺体萎缩、黏膜变薄或伴

[收稿日期] 20120713(005)

[基金项目] 甘肃中医学院研究生创新基金项目(CX2012-05)

[第一作者] 张莲,在读研究生,Tel:15101325655,E-mail:waiwojia_0725@126.com

[通讯作者] *周语平,教授,硕士生导师,从事经方防治肿瘤及器官纤维化的研究,Tel:13909449815,E-mail:zypjwc@163.com

有肠腺化生、不典型增生为特征。现代医学对于本病的治疗尚无理想治疗方法,主要是改善和缓解症状,如应用促动力药、胃黏膜保护剂、抗酸及抑酸剂等。而中医药凭借其明显的疗效在治疗 CAG 一直扮演着重要角色。查阅大量文献发现黄芪为养胃方剂中不可少的药物^[1]。为探讨黄芪主要提取物黄芪皂苷治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制,本课题以动物实验为基础,对切片进行显微镜下观察及特异性实验室检测指标,观察中药黄芪的单体黄芪皂苷对萎缩性胃炎大鼠 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88) 的表达的影响,研究其治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 黄芪皂苷(由甘肃中医学院科研实验中心药物制剂实验室提供,制作工艺:10 000 g,粉碎,过 20 目筛,加 20 倍原药量的 70% 乙醇,水浴回流 2.5 h,共 2 次,合并回流液,减压回收乙醇至 10 L 浓缩液,滤出药渣备用。10 L 浓缩液用水饱和和正丁醇萃取 3 次,分为水层和正丁醇层,水层用水饱和和乙酸乙酯萃取 3 次,取乙酸乙酯层液,浓缩浓缩的方法,得黄芪总黄酮。正丁醇层液,浓缩浓缩的方法,用氨水洗涤,得黄芪总皂苷,检验纯度为 84.6%),TLR4 和 MyD88(博士德公司)、硫糖铝(安徽仁济药业有限公司)。

1.2 仪器 AE200 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);光学显微镜(德国)、数码相机(日本)。

1.3 动物 SPF 级 Wister 大鼠 56 只,体重(200 ± 20)g,雌雄各半,甘肃中医学院动物中心提供,许可证号 SCXK(甘)2004(006)。

2 方法

2.1 动物及分组 大鼠随机分为 4 组:模型组、黄芪皂苷灌胃组、硫糖铝灌胃组、空白组(不造模)。

2.2 大鼠模型的建立 20 mmol·L⁻¹的脱氧胆酸钠 2 mL 每日空腹灌胃;现配的 0.02% 的氨水溶液供动物自由饮用,配合饥饿失常法,前 5 周自由进食水,后 5 周单日禁食,自由饮水,双日自由进食水。空白组每天灌服等体积的生理盐水。

2.3 造模成功标准 造模成功标准照 2003 年中华医学会消化内镜学分会制定的《慢性胃炎的内镜分型分级标准及治疗放入试行意见》。

2.4 给药方法 大鼠模型建立后,按人与大鼠体表面积折算法进行给药,黄芪皂苷 ig 剂量为 14.93 mg·kg⁻¹、硫糖铝的 ig 剂量为 360 mg·kg⁻¹,

空白组和模型组每日灌服生理盐水 2 mL/只,黄芪皂苷组和硫糖铝组按照大鼠体重计算给药量,然后溶于 2 mL 的生理盐水中,吹打成混悬液进行 ig,每天上午 ig 1 次,连续 ig 10 周,15 周后处死大鼠取材。

2.5 取材 血清制备:腹主动脉取血 4 mL,室温制备血清待测;大鼠胃组织取材:脱白法处死大鼠,立即剖腹暴露全胃,在距贲门和幽门 1.5 cm 处离断,取出全胃,沿胃大弯切开,观察胃黏膜的色泽、弹性。然后用生理盐水冲洗后,立即以 10% 的中性甲醛溶液固定,分别沿小弯侧和大弯侧条状取材。

2.6 组织切片的病理观察 一般情况:动物饲养过程中的精神状态、活动情况、毛发光泽度、食欲、大小便情况、体重。胃标本大体观察:观察胃黏膜的色泽、弹性等大体情况。病理组织学指标;对每张切片同时观察有无肠上皮化生、假性幽门腺化生、不典型增生的发生情况进行观察。

2.7 胃组织中 MyD88,TLR4,血清 SOD 活性的测定 取胃体和胃窦部组织的 PBD 制备成 10% 组织匀浆,离心取上清液采用酶联免疫双抗体夹心法测定 MyD88,TLR4 抗体,按试剂盒说明书进行,于 450 nm 测吸光度(A),计算出含量(ng·g⁻¹)。血清中的 SOD 活性,检测方法严格 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作。

2.8 统计学方法 所有资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 16.00 统计软件进行处理,计量资料组间进行单因素方差分析,计数资料用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察 黄芪皂苷组大鼠精神状态较好,活动灵活,毛发光泽度较好,在 ig 4 周时,大鼠食欲明显增强,体重增加较快,大小便逐渐趋于正常;硫糖铝组大鼠在灌胃 7 周时,大鼠精神状态逐渐转好,活动度较好,但大鼠食欲较差,体重增加不明显,大小便正常;生理盐水组大鼠精神状态较差,毛发黄,不爱活动,食欲较低,常有稀便,肉眼未见血便。

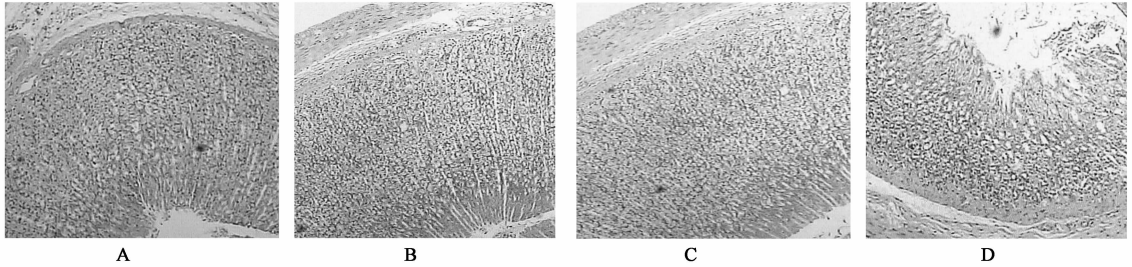
3.2 胃标本大体观察 黄芪皂苷灌胃 10 周时大鼠胃组织黏膜浅红色,黏膜弹性较好,只出现 1 例($n=7$)大鼠胃黏膜颜色改变,以红白相间为主,15 周时大鼠胃黏膜颜色逐渐好转,未见大鼠胃黏膜的异常改变;硫糖铝灌胃 10 周时,3 例($n=7$)胃组织黏膜颜色较好,弹性尚可,其余出现黏膜颜色的改变,以红白相间和灰白相间为主,灌胃 15 周时,只有 2 例胃黏膜的颜色改变,以红白相间为主,其余未见

异常;模型组大鼠灌胃 10 周时,胃黏膜灰白为主,也有红白相间,但以白象为主,黏膜血管暴露,弹性较差,灌胃 15 周时,胃黏膜颜色未见明显改变;空白组大鼠各观察指标正常,未见病态。

3.3 病理组织学指标观察 空白组大鼠胃黏膜上皮完整,上皮细胞排列整齐,无脱落或缺损,细胞呈单层柱状,腺上皮与腺管分界清楚,腺体形状规则,胞浆透明或呈小空泡状。生理盐水组大鼠胃黏膜层变薄,不完整,腺体不同程度的萎缩或消失,纤维组织的增生,

细胞形态大小不一;黄芪皂苷组胃黏膜上皮排列规整,腺体大小形态一致,固有腺体、胃壁细胞数和黏液细胞数与正常对照组相似;硫糖铝灌胃组组上皮细胞相对完整,腺体排列稍欠规整,表层黏膜无脱落,腺体无明显萎缩膜,炎细胞浸润显著减少。(图 1~2)。

3.4 组织中 MyD88, TLR4 的表达 黄芪皂苷组和硫糖铝组与模型组比较, MyD88, TLR4 的表达明显降低 ($P < 0.01$); 黄芪皂苷组与硫糖铝组比较 MyD88, TLR4 的表达降低 ($P < 0.05$), (表 1)。



A. 空白组; B. 黄芪皂苷 14.93 mg·kg⁻¹组; C. 硫糖铝 360 mg·kg⁻¹组; D. 模型组(图 2 同)

图 1 大鼠灌胃 10 周后,各组大鼠胃组织切片镜下观察(HE 染色,40 ×)

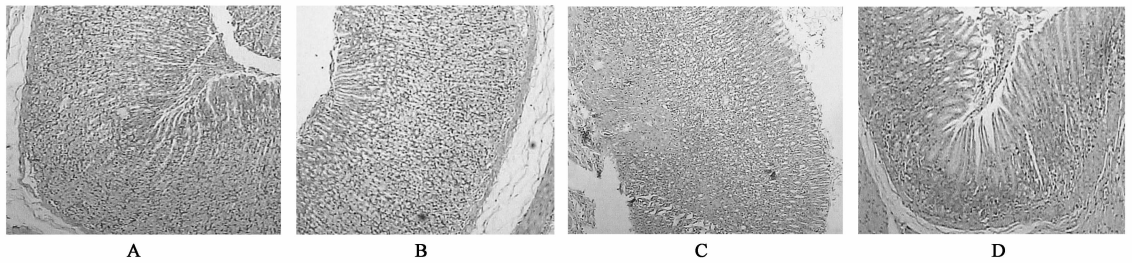


图 2 大鼠灌胃 15 周后,各组大鼠胃组织切片镜下观察(HE 染色, ×40)

表 1 黄芪皂苷对萎缩性胃炎大鼠胃组织中 MyD88, TLR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

ng·g⁻¹

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	10 周		15 周	
		MyD88	TLR4	MyD88	TLR4
黄芪皂苷	14.93	1.74 ± 0.09 ^{1,2)}	2.14 ± 0.02 ^{1,2)}	1.68 ± 0.05 ^{1,2)}	2.01 ± 0.05 ^{1,2)}
硫糖铝	360	1.89 ± 0.05 ²⁾	2.26 ± 0.08 ²⁾	1.82 ± 0.02 ²⁾	2.12 ± 0.07 ²⁾
模型	-	1.98 ± 0.04	2.35 ± 0.06	1.98 ± 0.03	2.25 ± 0.01
空白	-	1.72 ± 0.02	2.12 ± 0.05	1.62 ± 0.04	1.95 ± 0.08

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与硫糖铝组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.5 血清中 SOD 活性 黄芪皂苷组和硫糖铝组与模型组比较, SOD 活性增高 ($P < 0.01$), 与空白组相近, 黄芪皂苷组与硫糖铝组比较 SOD 活性增高 ($P < 0.05$), (表 2)。

4 讨论

TLR4 是众多 TLRs 家族成员中研究较深入的受体之一。TLR4 是介导天然免疫与炎症反应的模式识别受体,可识别外源性,内源性配体,经 MyD88 依赖和非 MyD88 依赖信号转导途径,诱发炎症反

表 2 黄芪皂苷对萎缩性胃炎大鼠血清中 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	
		10 周	15 周
黄芪皂苷	14.93	89.53 ± 10.03 ^{1,2)}	90.85 ± 12.57 ^{1,2)}
硫糖铝	360	85.78 ± 11.11 ²⁾	87.58 ± 13.86 ²⁾
模型	-	46.64 ± 9.11	50.12 ± 12.35
空白	-	90.12 ± 13.15	92.52 ± 9.14

应^[2-3]。TLR4 信号途径是不但是引起炎症的始动因素,同时也是维持炎症反应的持续刺激信号^[4],

只有当打断 TLR4 的信号通路,才有可能使得遏制炎症的持续发生^[5-6]。而在 CAG 发生过程中,TLR4-MyD88 介导的炎症反应发挥着重要的作用^[7]。SOD 是能清除超氧阴离子自由基(O_2^-)而起保护作用的重要抗氧化酶,是机体抗氧化损伤防御体系中的第一道防线^[8-9]。

CAG 为我国的常见病和疑难病,症状多见胃脘隐痛、喜温喜按、面色不华、倦怠乏力、食少便溏、舌淡胖、边有齿痕、脉沉细无力等脾虚证表现,而黄芪为养胃方剂中不可少的药物,健脾益气,中医理论认为,黄芪性甘,微温,归肺、脾经^[10]。日华子云:“黄芪,助气壮筋骨,长肉,补血,破癥瘕”。《名医别录》认为其“无毒,逐五脏间恶血,补丈夫虚损,五劳羸瘦,腹痛泄利,益气,利阴气”。从以上本草记载可知,黄芪有益气健脾、补虚生肌、“破癥瘕”的功效。CAG 患者多脾胃亏虚,日久气虚运血无力,血行迟滞致瘀,遂致胃黏膜萎缩。黄芪一味兼具益气健脾、活血化瘀的功效,与 CAG 的基本病机相吻合,故可以治疗萎缩性胃炎。然而黄芪治疗 CAG 的机制尚不明确,其有效成分尚不确定。

本实验利用黄芪提取物黄芪皂苷干于 CAG 模型大鼠,通过胃黏膜、组织切片病理观察以及 TLR4、MyD88 受体的表达,观察其对 CAG 模型大鼠的治疗作用。研究结果发现,黄芪皂苷治疗组大鼠精神状态较好,活动度、毛发光泽度较好,在灌胃 4 周时,大鼠食欲明显增强,体重增加较快,大小便逐渐趋于正常,胃黏膜浅红色,弹性较好;硫糖铝组大鼠精神状态逐渐转好,活动度较好,但大鼠食欲较差,体重增加不明显,大小便正常,胃黏膜弹性尚可,颜色以红白相间出现,模型组大鼠精神状态较差,毛发发黄,不爱活动,食欲较低,常有稀便,肉眼未见血便,胃黏膜灰白,也有红白相间,但以白象为主,黏膜血管暴露;通过组织切片病理观察发现黄芪皂苷组大鼠胃黏膜上皮排列规整,腺体大小形态一致,固有腺体、胃壁细胞数和黏液细胞数与正常对照组相似模型组大鼠胃黏膜层变薄,不完整,腺体不同程度的萎缩或消失,纤维组织的增生,细胞形态大小不一;硫糖铝灌胃组组上皮细胞相对完整,腺体排列稍欠规整,表层黏膜无脱落,腺体无明显萎缩膜,炎细胞浸润显著减少;TLR4, MyD88 受体的表达上,黄芪皂苷组表达量最低,明显低于模型组,和空白组表达相近,其次是硫糖铝组。同时而 SOD 活性表达上黄芪皂苷组表达较高,和空白组相近,其次为硫糖铝组。因此说明黄芪皂苷对于 CAG 具有较好的治疗作用,但是否

说明黄芪的有效成分就是黄芪皂苷,还有待于进一步的研究明确。

CAG 是临床消化系统的常见病和疑难病,是胃癌前疾病之一,防治该病有利于预防胃癌的发生,因此对于萎缩性胃炎的治疗任重而道远,而诸多研究表明^[11-13],中医药对于萎缩性胃炎的治疗有着很好的疗效,因此应该充分发挥中医药优势,开发中医药宝库,从而更好的服务于患者。

[参考文献]

- [1] 李卿姬,姜华,姜玉姬. 补阳还五汤含药血清对 Toll 样受体 4 信号转导通路及氧化低密度脂蛋白受体-表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):155.
- [2] Osamu Takeuchi, Shizuo Akira. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell,2010,140:805.
- [3] 侯金才,刘建勋,张鹏,等. 黄芩苷对缺氧/复氧小肠质细胞 TLR4 通路的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(3):572.
- [4] Maizels R M. Infections and allergy-helminths, hygiene and host immune regulation [J]. Current Opinion Immunol,2005,17(6):656.
- [5] 刘翔,林漫鹏,丁元伟,等. TLR4 在益生菌治疗小鼠 Hp 感染中的作用[J]. 中国现代医学杂志,2011,21(1):32.
- [6] 姜华姜,玉姬. 益气活血复方对 Toll 样受体 4 信号转导通路及下游炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(2):219.
- [7] 王常松,杨敏,俞杰,等. 人参丹参对萎缩性胃炎鼠模型胃黏膜保护及对 Bcl-xL、Bax、TLR4 和 NF- κ Bp65 表达影响随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志,2012,26(2):19,82.
- [8] 舒劲,李喜香,任远,等. 制萎扶胃浓缩丸对慢性萎缩性胃炎模型大鼠 SOD 活性、MDA 和 NO 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):160.
- [9] 江梅,李汀,张沂,等. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎血清和胃黏膜组织 SOD 和 MDA 的动态变化[J]. 中国消化内镜,2009,3(2):34.
- [10] 史瑞,李晓红,刘礼剑,等. 黄芪、三七及其配伍对萎缩性胃炎大鼠血清 PGE2、GAS、PG II 和 EGF 的影响[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(5):361.
- [11] 李晓红,史瑞,刘礼剑,等. 左金丸及其拆方治疗萎缩性胃炎模型大鼠的疗效观察[J]. 中国中医基础医学杂志,2012,18(4):383.
- [12] 张虹,成映霞,段永强,等. 治萎防变胶囊对气虚血瘀型慢性萎缩性胃炎模型大鼠生长抑素和免疫功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(6):35.
- [13] 韦维,林寿宁,朱永苹. 安胃汤对慢性萎缩性胃炎模型大鼠肠三叶因子基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):159.

[责任编辑 聂淑琴]