

普胃丸对复发胃溃疡大鼠抗氧化及改善胃黏膜血流的作用

贾欣, 冯永, 耿菲, 吕华, 刘淑梅, 白静, 齐亚娟*
(华北煤炭医学院药理教研室, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 研究普胃丸(PWP)对复发胃溃疡大鼠抗氧化及改善胃黏膜血流的作用。方法: 采用白细胞介素 1 (IL-1) 制备大鼠胃溃疡复发模型, 观察连续 ig PWP 90 d 胃组织病理学变化, 测定血浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)及胃黏膜组织 ET-1A 的表达。结果: PWP 能明显降低溃疡复发率, 增加血浆 SOD、NO 活性, 减少 MDA、ET-1 含量, 显著抑制复发胃溃疡胃黏膜组织中 ET-1A 的表达。结论: PWP 可抑制胃溃疡复发, 其机制与增强机体抗氧化及改善黏膜血流量有关。

[关键词] 胃溃疡; 复发; 普胃丸; 抗氧化; 血流量

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0183-03

Effect of Puwei Pill on Anti-oxidation and Improvement of Gastric Mucosal Blood Flow in Rats with Gastric Ulcer Recurrence

JIA Xin, FENG Yong, GENG Fei, LV Hua, LIU Shu-mei, BAI Jing, QI Ya-juan*

(The Department of Pharmacology, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of Puwei Pill(PWP) on the anti-oxidation and improvement of the gastric mucosal blood flow in the rats with gastric ulcer recurrence. **Method:** The gastric ulcer recurrence model was developed by intraperitoneal injection with interleukin-1 (IL-1). Then the pathohistological structure in the recurred gastric ulcer, treated by PWP(ig, 90 d), was observed. The superoxide dismutase(SOD), nitric oxide(NO), malondialdehyde(MDA) and endothelin-1(ET-1) in the plasma and ET-1A expressed in the gastric mucosa were determined. **Result:** PWP could significantly resist the recurrence of gastric ulcer, increase the SOD, NO activity and decrease the contents of MDA and ET-1 in plasma. At the same time, PWP could significantly inhibit the ET-1A expression in the gastric mucosa. **Conclusion:** PWP can prevent the recurrence of the gastric ulcer, which mechanism is probably related to the increase of anti-oxidation capacity and improvement of mucosal blood flow.

[Key words] gastric ulcer; recurrence; Puwei Pill; anti-oxidation; blood flow

胃溃疡(Gastric Ulcer, GU)是一种多发病。随着药物治疗的进展,消化性溃疡的愈合率日趋提高,但仍不能避免复发。GU患者停药后1年内复发率可达50~90%^[1],因此,减少复发成为治疗GU的关

键。前期试验已证实,普胃丸(PWP)对多种实验性GU具有保护作用^[2],本试验采用白细胞介素1(IL-1)制备大鼠GU复发模型,观察PWP抗GU复发作用,检测其对大鼠血浆超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)含量变化及黏膜组织ET-1A表达的影响,以考察PWP抗GU复发的机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠56只,雌雄各半,体重180~220g,由北京医科大学实验动物中心提供。

[收稿日期] 2009-11-12

[基金项目] 河北省唐山市科学技术研究与发展计划课题(08360202A-3)

[通讯作者] * 齐亚娟, Tel: (0315) 3725870; E-mail: yajuanqi@yahoo.com.cn

合格证号 SCKK(京) 20050013。

1.2 药品与试剂 PWP 由巴霜、明雄、郁金各 10 g, 乳香、没药、陈皮、木香、琥珀、胆星、紫豆蔻各 5 g 组成。制备方法: 郁金、乳香、没药、陈皮、木香、琥珀、胆星各药加入去离子水 400 mL, 浸泡 1 h 后, 常规煎煮 20 min 时, 加入紫豆蔻, 继续煎煮 20 min, 过滤, 留药液, 药渣再加入 200 mL 水, 常规煎煮 20 min, 过滤, 合并两次滤液, 浓缩至 1 g·mL⁻¹ 浸膏, 将制备好的巴霜、雄黄、琥珀粉及淀粉与流浸膏混合均匀, 制成小丸, 室温下阴凉处干燥, 制得普胃丸(1.3 g 生药·g⁻¹) 备用; 奥美拉唑肠溶片 (OMLZ), 长春北华药业有限公司, 批号 H10920058。合成人白细胞介素 1 (IL-1) 为英国 Peptotech 公司; SOD、MDA、NO 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 血浆 ET-1 放射试剂盒购自北京普尔伟业生物科技有限公司; 兔抗鼠 ET-1A 多克隆抗体、SABC 免疫组化、DAB 显色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 分组与 GU 复发模型制备 56 只大鼠随机分为 6 组, 即正常组、假手术组、模型未复发组各 8 只, PWP 组、OMLZ 组各 10 只, 模型复发组 12 只。按照 Takagi 方法改良制备 GU 模型^[3], 将禁食 24 h、自由饮水的大鼠注射麻醉后, 仰位固定剪毛、消毒, 于剑突下纵向切开腹壁约 2 cm, 取出胃, 在胃窦前壁近小弯侧达胃壁肌层与浆膜层之间, 注入 20% 乙酸 0.05 mL, 持续 60 s, 用滤纸抹干, 生理盐水涂抹两遍, 还纳缝合, 假手术组用生理盐水代替乙酸。术后 24 h 后给药, PWP 组 ig PWP(240 mg·kg⁻¹, 每天 1 次), OMLZ 组 ig OMLZ(3.6 mg·kg⁻¹, 每天 1 次), 其余各组每天给予等量蒸馏水, 90 d 后采用 IL-1 制备 GU 复发模型^[4], 即模型未复发组大鼠 ip 等量生理盐水, 其余各组大鼠均 ip IL-1 1 μg·kg⁻¹, 于 48 h 后水合氯醛麻醉(处死前禁食 24 h), 腹主动脉取血, 取胃后沿胃大弯剪开, 放大镜下观察, 以有溃疡、黏膜苍白、糜烂、充血、水肿等判定为溃疡复发。

2.2 GU 复发大鼠胃黏膜组织病理学观察 于造模处剪取含溃疡部位约(1×1) cm 胃组织, 无溃疡者在相应部位取材, 4% 多聚甲醛固定, HE 染色, 光镜观察胃黏膜组织病理学变化。

2.3 血浆 SOD、MDA 含量检测 按照试剂盒说明书, 采用羟胺法检测血浆 SOD 活性, TAB 法测定 MDA 含量。

2.4 血浆 NO、ET-1 含量检测 按照试剂盒说明书, 采用硝酸酶还原法检测血浆 NO 活性, 放射免疫法测定 ET-1 含量。

2.5 胃黏膜组织 ET-1A 蛋白表达的检测 采用免疫组化 SABC 法, 按说明书进行, 阴性对照用 PBS 代替一抗, ET-1A 的工作浓度为 1:100, 以细胞胞浆出现棕黄色颗粒为 ET-1A 表达阳性。每张切片在 200 倍光镜下拍 10 个视野, 采用 Motic image advanced 6.0 软件对图像进行分析, 以灰度值表示阳性细胞着色强度, 以阳性着色面积占总面积百分比表示阳性密度。

2.6 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 15.0 统计软件进行处理, 多组间比较采用 One-Way ANOVA 进行分析, 计数资料用 Chi-Square 检验。

3 结果

3.1 PWP 对 GU 复发大鼠溃疡复发率的影响 ip IL-1 后, 正常和假手术组未见溃疡, 胃黏膜皱襞有序, 黏膜色淡红; 模型未复发组大鼠溃疡均愈合; 模型复发组有 10 只大鼠在原溃疡造模部位复发, 溃疡较深、大, 复发率为 83.3%; 与模型复发组比较, OMLZ 组和 PWP 组溃疡复发率均明显降低, 分别为 33.3% ($P < 0.05$)、10.0% ($P < 0.01$), 结果见表 1。

表 1 PWP 对 GU 复发大鼠复发率、血清 SOD 活性、MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	复发率 /%	SOD /U·L ⁻¹	MDA /μg·L ⁻¹
正常	—	8	0 ²⁾	0.117 ±0.013 ²⁾	6.14 ±2.07 ¹⁾
假手术	—	8	0 ²⁾	0.116 ±0.014 ²⁾	6.14 ±2.11 ¹⁾
模型未复发	—	8	0 ²⁾	0.116 ±0.011 ²⁾	6.14 ±1.77 ¹⁾
模型复发	—	12	83.3	0.0973 ±0.010	7.34 ±2.72
OMLZ	0.003 6	10	33.3 ¹⁾	0.131 ±0.013 ²⁾	5.07 ±0.78 ¹⁾
PWP	0.24	10	10.0 ²⁾	0.133 ±0.012 ²⁾	4.63 ±1.00 ²⁾

注: 与模型复发组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 PWP 对 GU 复发大鼠胃黏膜组织病理学的影响 ip IL-1 后, 正常组和假手术组未见溃疡, 胃组织结构正常清晰, 黏膜固有层有少量淋巴细胞浸润。模型组未见复发, 但胃黏膜变薄, 腺体排列欠规整, 黏膜下为瘢痕组织, 瘢痕黏膜有慢性炎性细胞浸润。模型复发组溃疡侵犯黏膜全层, 溃疡边缘可见残留的再生黏膜, 有大量炎性细胞浸润, 以中性粒细胞浸润明显。PWP 组、OMLZ 组再生黏膜较厚, 黏膜修复

较完全,排列较整齐。

3.3 PWP 对 GU 复发大鼠血浆 SOD 活性、MDA 含量的影响 如表 1 所示,与模型未复发组比较,模型复发组大鼠血浆中 SOD 活性显著下降,MDA 含量明显升高,说明 SOD、MDA 参与了溃疡的复发;与模型复发组比较,PWP 能显著升高 GU 复发大鼠血浆 SOD 活力 ($P < 0.01$),降低 MDA 含量 ($P < 0.01$),表明 PWP 可抗氧化作用。

3.4 PWP 对 GU 复发大鼠血浆 NO 活性、ET-1 含量的影响 如表 2 所示,与模型未复发组比较,模型复发组大鼠血浆中 NO 活性显著下降,ET-1 含量明显升高,说明 NO、ET-1 通过影响胃黏膜血流也参与了溃疡的复发;与模型复发组比较,PWP 能显著升高 GU 复发大鼠血浆 NO 活力 ($P < 0.01$),降低 ET-1 含量 ($P < 0.01$),表明 PWP 可增加胃黏膜血流量。

表 2 PWP 对 GU 复发大鼠血浆 NO 活性、ET-1 含量的影响 (柳士)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	NO /μmol·L ⁻¹	ET-1 /ng·L ⁻¹
正常	—	8	9.22 ± 0.19 ²⁾	102.89 ± 8.44 ²⁾
假手术	—	8	8.94 ± 0.21 ²⁾	133.66 ± 14.62 ²⁾
模型未复发	—	8	8.77 ± 0.24 ²⁾	137.12 ± 11.84 ²⁾
模型复发	—	12	4.48 ± 0.48	183.36 ± 23.29
OMLZ	0.003 6	10	13.49 ± 2.77 ²⁾	110.20 ± 10.32 ²⁾
PWP	0.24	10	12.47 ± 0.19 ²⁾	116.63 ± 12.79 ²⁾

3.5 PWP 对 GU 复发大鼠胃黏膜组织 ET-1A 蛋白表达的影响 如图 1,表 3 所示,与模型未复发组比较,模型复发组大鼠胃黏膜 ET-1A 蛋白平均灰度值、阳性密度均升高,说明模型复发组胃黏膜组织 ET-1A 蛋白表达明显增加;与模型复发组比较,PWP 组大鼠胃黏膜 ET-1A 蛋白平均灰度值、阳性密度均下降,表明 PWP 可降低胃黏膜组织 ET-1A 蛋白表达。

表 3 ET-1A 免疫阳性物质在 GU 复发大鼠胃黏膜组织中的分布与表达 (柳士)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	平均灰度值	平均阳性密度
正常	—	8	74.87 ± 2.13 ²⁾	20.16 ± 1.81 ²⁾
假手术	—	8	77.39 ± 1.82 ²⁾	20.89 ± 1.42 ²⁾
模型未复发	—	8	79.15 ± 2.11 ²⁾	20.68 ± 2.29 ²⁾
模型复发	—	12	99.23 ± 2.14	26.69 ± 3.03
OMLZ	0.003 6	10	92.08 ± 2.63 ¹⁾	25.00 ± 2.73
PWP	0.24	10	86.41 ± 2.02 ²⁾	22.19 ± 2.30 ¹⁾

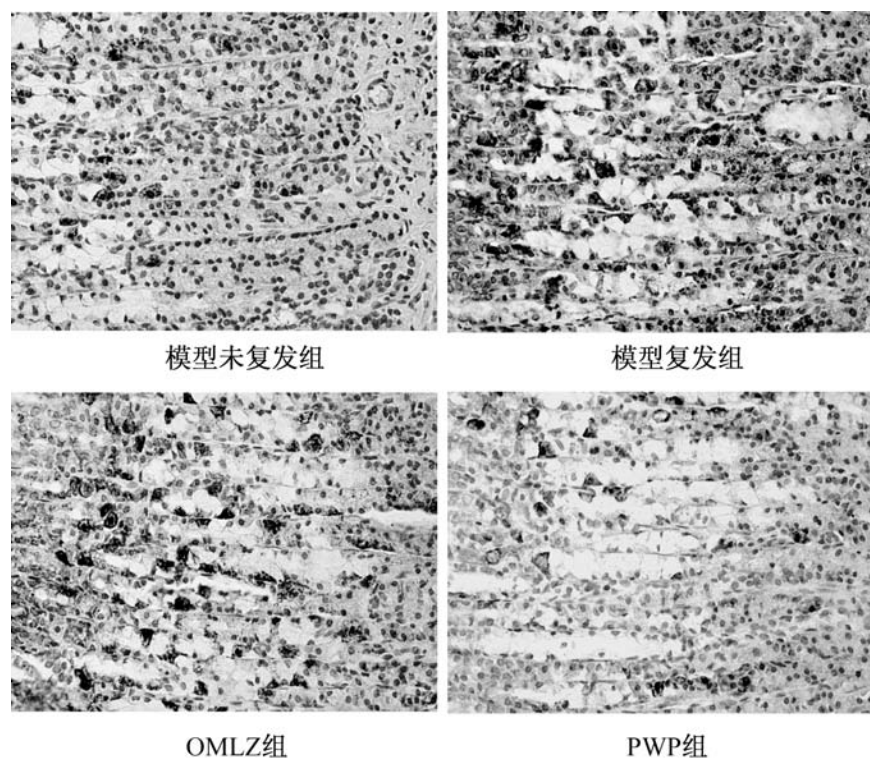


图 1 GU 复发大鼠胃黏膜组织中 ET-1A 免疫阳性物质的分布与表达 (×200)

4 讨论

乙酸性 GU 是一种慢性溃疡模型,造模 90 d 后溃疡已完全愈合。IL-1 主要由单核细胞、巨噬细胞等炎症细胞产生,可致胃黏膜急性损伤,从而诱导乙酸性 GU 复发,其病理特点与人类慢性 GU 相似^[5]。本实验中正常组和假手术组无自发性溃疡,模型复发组有 83.3% 复发,说明制备 GU 复发模型成功。

胃肠黏膜在化学物质、缺血或细胞能量不足等情况下可产生大量的氧自由基,引起胃黏膜脂质过氧化,导致胃黏膜血流障碍,进而引发胃黏膜损伤。SOD 是体内氧自由基清除系统的首要防线,细胞内氧自由基水平增加时,可诱导 SOD 生物合成或活性增加^[6],从而抑制胃黏膜中的脂质过氧化反应,并通过其代谢产物 MDA 含量间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。另外,Kwiecin^[7]等发现,NO 可通过提高 SOD 活性、降低 MDA 含量来清除胃黏膜损伤产生的氧自由基,可见 NO 对胃黏膜具有保护作用。NO 作为内源性血管舒张因子,通过维持胃黏膜上皮细胞的完整性、改善胃黏膜血流、促进黏液分泌和黏膜损伤后的修复而发挥作用。ET-1 是强烈的内源性缩血管物质,属于胃黏膜侵袭因素,ET 可拮抗 NO 使 ET、NO 失衡,从而导致胃黏膜血流下降,造成组织缺血性损伤,终致溃疡形成^[8]。

本研究发现,模型复发组血浆 SOD 活性降低,MDA 含量升高,表明氧自由基参与了溃疡的复发。PWP 组可显著升高 GU 复发大鼠血浆 SOD 活力,降低 MDA 含量,表明 PWP 通过抗氧化作用保护胃黏