

玄归滴丸对大鼠急性胃溃疡的保护作用

盛媛媛¹, 李莉莉¹, 张鑫¹, 王金磊², 张艳军¹, 庄朋伟^{1*}

1. 天津市中药药理学重点实验室, 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

2. 天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂, 天津 300401

摘要: **目的** 考察玄归滴丸对乙醇致大鼠急性胃溃疡的保护作用并探讨其作用机制。**方法** 65只SD大鼠随机分为对照组、模型组、西咪替丁(50 mg/kg)组和玄归滴丸低、中、高剂量(50、100、200 mg/kg, 分别为临床等效剂量的2、4、8倍)组。给药组ig给予相应的受试药物, 对照组及模型组ig相同剂量的生理盐水, 连续7 d, 除了对照组外, 其余各组均ig无水乙醇制备乙醇型胃溃疡模型。造模1 h后处死大鼠, 取胃组织进行大体形态观察, 并进行HE染色, 光镜下观察病理形态变化; 试剂盒法检测胃组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素E₂(PGE₂)和解痉多肽(SP)含量。**结果** 玄归滴丸组的胃黏膜损伤程度、病理变化与模型组比较均有不同程度的减轻。与模型组比较, 玄归滴丸中剂量组SOD和低、中剂量组MPO水平均显著升高($P < 0.05$ 、 0.01); 中剂量组MDA水平显著降低($P < 0.05$); 各剂量组TNF- α 水平呈降低趋势; 低剂量组PGE₂含量显著升高($P < 0.05$); 高剂量组SP含量显著降低($P < 0.05$)。**结论** 玄归滴丸对乙醇致急性胃溃疡实验大鼠的胃黏膜损伤有较好的保护作用, 其作用机制可能与抗氧化、抗炎作用有关。

关键词: 玄归滴丸; 急性胃溃疡; 抗炎; 自由基; 抗氧化

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2019)01-0084-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.012

Effect of Xuangui Dropping Pills on acute gastric ulcer in rats

SHENG Yuanyuan¹, LI Lili¹, ZHANG Xin¹, WANG Jinlei², ZHANG Yanjun¹, ZHUANG Pengwei¹

1. Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. The sixth Chinese medicine factory of Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300401, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Xuangui Dropping Pills on alcohol-induced acute gastric ulcer in rats and explore its mechanism. **Methods** A total of 65 SD rats were randomly divided into control group, model group, cimetidine group (50 mg/kg) and Xuangui Dropping Pills low, medium and high dose (50, 100 and 200 mg/kg, 2, 4, 8 times of clinical equivalent dose, respectively) groups. The rats in the treatment group were given the corresponding drugs by gavage. The rats in control group and model group were fed with the same dose of saline for seven consecutive days. Except for control group, modeling of experimental gastric ulcer was carried out in all the other groups with anhydrous ethanol. Rats were executed one hour after establishment of model, and the gastric tissues were taken for gross morphological observation, HE staining and light microscopy were used to observe the pathological changes. The contents of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), prostaglandin E₂ (PGE₂) and spasmolytic polypeptide (SP) in gastric tissues were detected by kit method. **Results** Compared with model group, the degree of gastric mucosal injury and pathological changes in Xuangui Dropping Pills group were alleviated in varying degrees. Compared with model group, the SOD and MPO levels of Xuangui Dropping Pills in middle dose group increased significantly ($P < 0.05$ and 0.01), while the MDA level in middle dose group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with control group, the level of TNF-alpha in model group increased, and the content of TNF- α decreased after Xuangui Dropping Pill intervention. Compared with model group, the content of PGE₂ in Xuangui Dropping Pills low dose group was significantly higher ($P < 0.05$), while the content of SP in high dose group was significantly

收稿日期: 2018-05-30

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT_14R41)

第一作者: 盛媛媛(1995—),女,硕士研究生,专业方向为药理学。Tel: 18822181029 E-mail: syy31121@163.com

*通信作者: 庄朋伟(1982—),男,博士,副教授,专业方向为中药药理。E-mail: zhuangpengwei@tjucm.edu.cn

lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Xuanguai Dropping Pills can protect gastric mucosal injury induced by ethanol in rats with acute gastric ulcer. Its mechanism may be related to the regulation of SOD, MPO, SP, TNF- α and PGE₂ expression.

Key words: Xuanguai Dropping Pills; acute gastric ulcer; anti-inflammation; free radical; anti-oxidation

胃溃疡是发病率逐年增高的多发病,最主要的特点是病程长且易反复。玄归滴丸由延胡索、当归、川芎等中药材经提取、精制而成,具有活血化瘀、行气止痛等功效^[1],用于女性原发性痛经的治疗。本课题组前期研究发现,玄归滴丸可以通过降低结肠组织炎症反应,改善结肠组织病理变化,对溃疡性结肠炎发挥一定的治疗作用^[2]。但目前玄归滴丸对胃溃疡的治疗作用未见报道,为进一步扩大其临床适应症,本实验拟通过复制无水乙醇诱导的急性大鼠胃溃疡模型,观察不同组别胃黏膜溃疡程度,并测定组织生化指标,探究玄归滴丸对乙醇型胃溃疡的作用及机制,为其临床应用及二次开发提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SD大鼠,雄性,65只,体质量(210±10)g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2014-0004。

1.2 药物及主要试剂

玄归滴丸,天津中新药业第六中药厂提供,批号606004,每丸40mg;西咪替丁,天津力生制药股份有限公司提供,批号1609013·10;羧甲基纤维素钠,北京索莱宝科技有限公司提供,批号108D212;超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor - α , TNF - α)、前列腺素E₂(Prostaglandin E₂, PGE₂)和解痉多肽(spasmolytic polypeptide, SP)酶联免疫吸附测定试剂盒,均由上海宝曼生物科技有限公司提供;BCA蛋白定量试剂盒,原平皓生物技术有限公司,批号000056,500次。

1.3 主要仪器

多功能酶标仪,生产厂家为infinite M200 PRO(瑞士)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将大鼠随机分为对照组、模型组、西咪替丁(50 mg/kg,阳性药)组和玄归滴丸低、中、高剂量(50、100、200 mg/kg,分别为临床等效剂量的2、4、8倍)组,受试药物以生理盐水为溶剂配置成对应浓度的

混悬液。适应性饲养3d后,给药组ig给予相应的受试药物,对照组及模型组ig相同剂量的生理盐水,给药体积为5 mL/kg,连续7d,前4天正常饮食,第5天起禁食不禁水72h,期间记录各组大鼠的体质量变化。末次给药0.5h后,除了对照组给予生理盐水外其余各组均ig无水乙醇1.5 mL,制备乙醇型胃溃疡模型,约1h后注意小鼠状况,是否出现不适、烦躁等,造模1h后处死并取胃组织进行大体观察及相关指标检测。通过对胃黏膜形态进行观察,如出现黑红色条状损伤确定模型成功。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 胃组织取材 结扎幽门及贲门,摘取整胃,从幽门沿胃大弯剪开,清洗干净后,将胃铺平,观察胃黏膜溃疡程度。每组取3只胃置于10%的多聚甲醛中固定,其余用超低温冰箱保存,用于指标测定。

2.2.2 胃组织生化指标检测 取胃剪碎后加入冰生理盐水,于冰上制备10%组织匀浆,之后4℃、3000 r/min离心15 min,取上清液。为了定量胃组织匀浆液中相关指标含量,采用BCA法对总蛋白进行定量测定。将SOD、MDA、MPO、SP、TNF- α 、PGE₂等试剂盒在室温下放置20 min后,取出所需板条。按需设置标准品孔和样本孔后,在标准品孔中各加不同浓度的标准品50 μ L;样本孔中先加待测样本10 μ L,再加入样本稀释液40 μ L进行稀释;空白孔不作任何处理。除空白孔外,每孔加入100 μ L用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体,用封板膜封板后于37℃温育60 min。弃去液体,于吸水纸上拍干。每孔加满洗涤液(20×洗涤缓冲液按1:20稀释),静置1 min后弃去,于吸水纸上拍干,如此重复上述5次。之后每孔分别加入底物A、B各50 μ L,37℃避光孵育15 min,最后每孔加50 μ L终止液,在15 min内使用多功能酶标仪于450 nm波长处测定各孔的吸光度(A)值。

2.2.3 胃组织病理学检测 取胃组织置于10%的多聚甲醛中固定,进行石蜡包埋,采用石蜡切片机以5 μ m厚度连续切片,行HE染色,光镜下观察胃组织病理形态变化。

2.3 统计学处理

运用SPSS 19.0统计软件分析各组数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用方差分析,组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 对胃组织大体形态及病理的影响

取胃组织进行大体形态观察,结果显示,对照组大鼠胃组织结构完整,大小、形态正常,胃和黏膜清洁。模型组胃黏膜表现出明显的胃黏膜损伤,出现黑褐色的出血点。玄归滴丸组和西咪替丁组的胃黏膜损伤程度与模型组比较均有不同程度的减轻,其中以中剂量效果最好。结果见图1。

胃组织病理观察结果显示,模型组胃黏膜损伤明显,突出表现在黏膜下水肿,出现炎细胞浸润、部分胃黏膜结构紊乱、萎缩,腺体被大量破坏,大量坏死的黏膜脱落。与模型组比较,西咪替丁组和玄归滴丸组胃组织病变有明显改善。结果见图2。

3.2 玄归滴丸对胃黏膜组织中氧化因子的影响

与对照组比较,模型组SOD、MPO的含量显著降低($P<0.05, 0.01$),MDA水平升高。与模型组比较,玄归滴丸中剂量组SOD,低、中剂量组MPO水平均显著升高($P<0.05, 0.01$);中剂量组MDA显著降低($P<0.05$)。结果提示,玄归滴丸可增强胃黏膜组织抗氧化能力,结果见表1。

3.3 对胃组织中SP、TNF- α 、PGE₂物质含量的影响

炎性及疼痛相关介质检测结果表明,与对照组比较,模型组TNF- α 水平呈升高趋势,玄归滴丸干

预后其含量有降低趋势。与对照组比较,模型组的PGE₂含量显著降低($P<0.01$),玄归滴丸低剂量组可显著升高PGE₂含量($P<0.05$);针对SP而言,与对照组比较,模型组SP物质升高,给药后与模型组比较,玄归滴丸高剂量组SP含量显著降低($P<0.05$),结果见表2。结果提示,玄归滴丸可以缓解胃黏膜炎症反应,减少疼痛相关物质的表达。

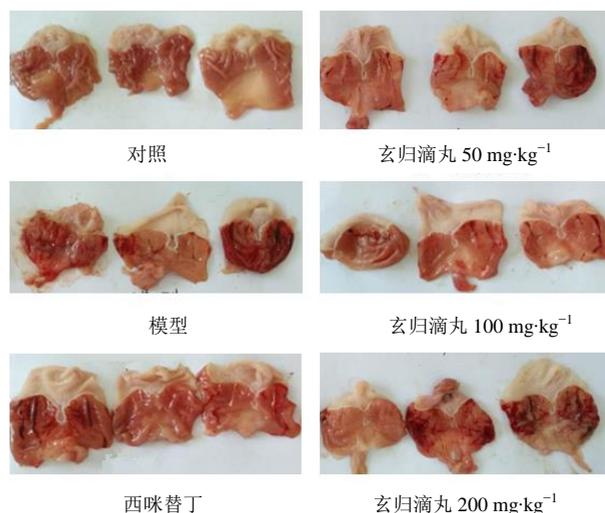


图1 玄归滴丸对胃大体形态的影响
Fig. 1 Effect of Xuangui Dropping Pills on gross morphology of stomach

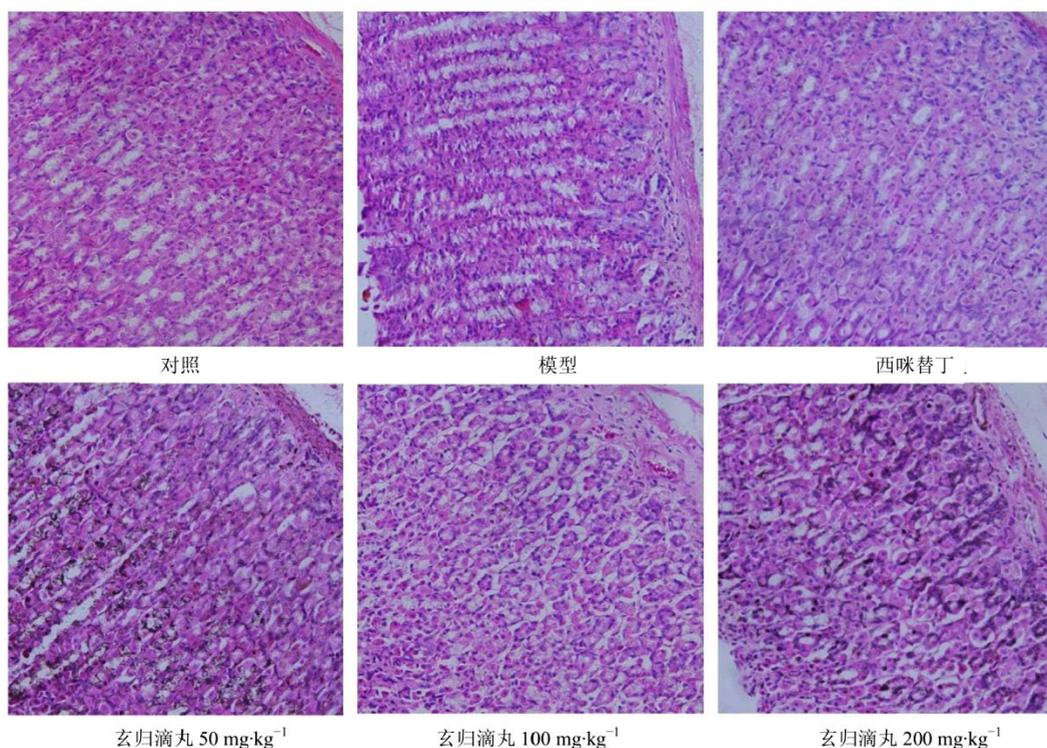


图2 玄归滴丸对胃组织病理变化的影响
Fig. 2 Effect of Xuangui Dropping Pills on pathological changes of gastric tissue

表1 玄归滴丸对胃黏膜组织中氧化因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Xuangui Dropping Pills on oxidatnt factors of gastric mucosal tissue ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MPO/(pg·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	355.5±49.11	482.4±90.57	9.54±0.58
模型	—	282.3±38.80 [#]	349.8±59.04 [#]	11.97±1.12
西咪替丁	50	338.3±87.84	445.8±99.87 [*]	10.78±1.97
玄归滴丸	50	328.5±79.96	495.6±93.22 ^{**}	10.44±2.51
	100	379.7±82.55 [*]	422.2±111.0 [*]	8.64±2.60 [*]
	200	346.4±90.99	333.1±66.87	10.96±1.97

与对照组比较:[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01;与模型组比较:^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01

[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group

表2 玄归滴丸对炎性相关因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Xuangui Dropping Pills on inflammatory factors ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mg ⁻¹)	SP/(pg·mg ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mg ⁻¹)
正常	—	248.7±27.97	98.99±11.63	528.5±73.51
模型	—	276.1±51.35	109.6±13.84	427.6±67.10 [#]
西咪替丁	50	250.2±48.29	96.38±19.28	415.9±78.68
玄归滴丸	50	231.5±65.39	96.80±29.31	486.5±50.51 [*]
	100	233.9±57.59	94.49±24.34	459.6±70.00
	200	247.3±61.87	84.95±11.78 [*]	405.3±71.53

与对照组比较:^{##}*P*<0.01;与模型组比较:^{*}*P*<0.05

^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 vs model group

4 讨论

在治疗胃溃疡方面,西药具有给药方便、起效快的优点,但同时具有远期溃疡复发率高,药物顺应性和耐药性的缺点。中药在治疗胃溃疡方面越来越受到人们的关注。中医药在改善全身状况、稳定病情及减少副作用等方面具有优越性,运用中药治疗胃溃疡历史悠久、疗效确切^[2]。中药治疗胃溃疡具有疗效可靠、复发率低、不良反应少等优点^[4]。玄归止痛滴丸是由延胡索、当归、川芎等中药材经提取、精制而成的纯中药滴丸,具有活血化瘀,行气止痛等功效^[1]。动物实验结果已表明,玄归止痛滴丸具有显著的镇痛、抗炎、活血作用^[2,5],临床主要用于胃寒气滞疼痛、头痛等症的治疗^[6]。

胃溃疡是消化系统常见疾病多发病,临床表现具有三性特点:周期性发作、慢性过程、节律性疼痛^[7]。其典型表现为饥饿不适、饱胀嗝气、泛酸或者餐后定时的慢性中上腹疼痛,严重时可见黑便与呕血^[8]。胃溃疡在消化内科的发病率呈逐步增高趋势^[9],胃溃疡在全球的发病率约为10%,且常见于中老年人群,约1%的胃溃疡可恶化发展为胃癌。乙醇诱导的胃溃疡模型较其它胃溃疡模型制备方法简单,溃疡发生率高,并且乙醇引起的胃黏膜急性

损伤机制明确,有利于研究中药对溃疡预防和保护的机制^[10]。

因此本实验用无水乙醇造模,检测生化指标SOD、MPO、SP、TNF-α、PGE₂、MDA的含量及活性,探究玄归滴丸对于胃溃疡的治疗作用。由结果可知,玄归滴丸能显著缩小乙醇性胃溃疡的溃疡灶,减少胃黏膜损伤,其中以中剂量效果最好。生化指标分析结果表明,玄归滴丸显著增加SOD活性,使PGE₂、MPO含量增加,并降低MAD、TNF-α、SP的含量,其中玄归滴丸4倍临床等效剂量组对SOD和MDA影响最大,2倍临床等效剂量组中PGE₂含量最高,8倍临床等效剂量组的SP含量最低。

无水乙醇诱发胃溃疡可导致其机体抗氧化能力下降,自由基形成增多^[11],从而引发胃黏膜损伤。MDA即血浆中过氧化脂(LPO)的代谢产物,MDA含量间接地反映出机体细胞受氧自由基攻击的严重程度^[12]。SOD是一种存在于生物体内的一种抗氧化酶,能特异性清除超氧阴离子,催化超氧化自由基分解成H₂O₂^[13],含量多少反映了清除体内如炎症产生的氧自由基的能力,含量下降则表示炎症趋于严重。PGE₂是一种胃黏膜部分防御因子,具有抑制胃酸分泌、免疫抑制和抗炎的作用,PGE₂含

量升高表明用药对胃黏膜有保护作用^[14]。MPO是生物体内中性粒细胞中产生的一种重要的过氧化物酶^[15]，作为中性粒细胞的功能标志和激活标志，含量升高则说明体内炎症反应减轻。TNF- α 能促进T细胞产生各种炎症因子，进而促进炎症反应的生成。SP是一种三叶肽，其机制复杂尚未完全证明，可能与增强胃黏膜对损害因子的抵抗作用有关。

本实验结果提示，玄归滴丸对乙醇所致的急性胃溃疡性具有一定防治作用，能有效降低胃黏膜损伤，升高SOD、MPO、PGE₂含量，而降低MDA、TNF- α 和SP物质的含量，玄归滴丸防治急性胃溃疡的作用可能与其抗氧化、抗炎作用有关。

参考文献

- [1] 王践玲, 张雪菊. HPLC测定玄归止痛滴丸中延胡索乙素的含量 [J]. 中成药, 2006, 28(8): 1242-1243.
- [2] 李莉莉, 盛媛媛, 张鑫, 等. 玄归滴丸治疗实验性小鼠溃疡性结肠炎的作用研究 [J]. 中南药学, 2018, 16(7): 944-947.
- [3] 廖新麟, 唐秀能. 中药治疗胃溃疡的作用机制研究概述 [J]. 中国药师, 2009, 12(3): 387-389.
- [4] 王慧, 甘超汝, 张杰, 等. 参积护胃颗粒对无水乙醇诱导大鼠实验性胃溃疡的保护作用研究 [J]. 中南药学, 2014, 12(4): 315-318.
- [5] 邱财荣, 张琰, 刘锋, 等. 玄归止痛滴丸治疗100例气滞血瘀型胃痛的治疗观察 [J]. 药学服务与研究, 2009, 9(3): 197-199.
- [6] 张琰, 邱财荣, 赵兴红, 等. 玄归止痛滴丸对气血淤滞所致疼痛的药效学研究 [J]. 中国药房, 2008, 19(6): 415-417.
- [7] 邱鹏程. 元胡止痛片治疗溃疡型胃痛的物效机制 [D]. 第四军医大学, 2013.
- [8] 陈伟良, 伍振峰, 邓中银, 等. 中医药在抗胃溃疡研究应用中的现状与进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 362-367.
- [9] 尹炳坚. 奥美拉唑治疗胃溃疡合并出血56例疗效分析 [J]. 当代医学, 2011, 17(36): 148-149.
- [10] 史李娜, 王雪飞, 马桂芝, 等. 石榴皮多酚有效部位单次给药毒性及对无水乙醇致大鼠胃溃疡的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(5): 709-715.
- [11] 张朋, 马骏, 宋薇, 等. 乳香没药药对在不同配比对无水乙醇致小鼠胃溃疡的保护作用 [J]. 甘肃中医学院学报, 2009, 26(1): 12-13.
- [12] 毕珺辉, 杨天仁. 香砂六君子汤及其拆方对脾虚胃溃疡模型大鼠胃蛋白酶、SOD、MDA水平的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(4): 280-282.
- [13] 陈建国, 邓虹珠. 苦豆子总碱对大鼠实验性结肠炎SOD,MDA,NO,MPO表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 323-325.
- [14] 于文涛, 方朝义, 李强, 等. 胃炎饮对胃溃疡大鼠胃黏膜前列腺素E₂表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(21): 6043-6044.
- [15] 张真瑞, 刘晓伟, 彭树灵, 等. 维胃方对胃溃疡大鼠胃黏膜MPO、H⁺-K⁺-ATP酶活性的影响 [J]. 天津中医药, 2010, 27(5): 406-408.