

新癆片中药成分对吡哌美辛胃肠毒性的减毒作用机制研究

刘 静¹, 邸志权¹, 王晶晶¹, 王春风², 包侠萍², 申秀萍^{1*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 厦门中药厂有限公司, 福建 厦门 361100

摘要: **目的** 研究新癆片中药成分对吡哌美辛产生的胃肠毒性反应的减毒作用机制。**方法** 大鼠分别 ig 给予新癆片及相当剂量的吡哌美辛, 每日 1 次, 连续给予 3 d, 测定各组大鼠胃酸分泌量及胃蛋白酶活性; 测定血清胃泌素、环氧酶-1 (COX-1)、环氧酶-2 (COX-2) 等指标; 大鼠分别 ig 给予新癆片及相当剂量的吡哌美辛, 每日 1 次, 连续给予 2 周, 进行肝组织基因表达芯片分析, 研究新癆片及吡哌美辛对胃肠毒性相关基因的影响。**结果** 吡哌美辛可促进大鼠胃泌素分泌, 从而促进胃酸分泌及增加胃蛋白酶活性, 新癆片能显著抑制胃泌素分泌, 抑制胃蛋白酶活性, 对胃酸分泌增加有一定的抑制作用。吡哌美辛可显著抑制 COX-1 活力, 而与吡哌美辛比较, 新癆片可以升高 COX-1 活性。吡哌美辛能显著下调基质金属蛋白酶 2 (Mmp2) 表达, 上调穿孔蛋白基因表达, 显著下调免疫、凝血系统相关基因表达; 与吡哌美辛比较, 新癆片能显著上调 Mmp2、紧密连接蛋白 1 (Cldn1) 表达, 下调穿孔蛋白基因表达, 显著上调免疫相关基因、凝血因子、纤维蛋白原表达。**结论** 新癆片中药成分对吡哌美辛胃肠毒性的减毒作用机制可能与其抑制胃泌素分泌增加、提高被吡哌美辛抑制的 COX-1 活性, 以及上调 Cldn1 表达, 下调穿孔蛋白表达, 增加细胞膜稳定性, 上调免疫相关蛋白基因、凝血因子、纤维蛋白原表达, 促进伤口修复有关。

关键词: 新癆片; 吡哌美辛; 基因芯片; 胃溃疡; 减毒作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2014)08 - 1115 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.014

Mechanism of Chinese herbal ingredients in Xinhuang Tablet on attenuating gastrointestinal toxicity induced by indomethacin

LIU Jing¹, DI Zhi-quan¹, WANG Jing-jing¹, WANG Chun-feng², BAO Xia-ping², SHEN Xiu-ping¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Xiamen Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Xiamen 361100, China

Abstract: Objective To study the mechanism of Chinese herbal ingredients in Xinhuang Tablet on attenuating gastrointestinal toxicity induced by indomethacin. **Methods** Xinhuang Tablet and a considerable dose of indomethacin were ig given to rats once a daily, lasted for 3 d, and then the levels of gastric acid, the activity of gastric protease, and the indexes of the serum gastrin, COX-1, COX-2, etc were determined. Xinhuang Tablet and a considerable dose of indomethacin were ig given to rats once daily, lasted for 2 weeks, and then the liver tissue gene expression microarray analysis was applied to research the effects of Xinhuang Tablet and indomethacin on the gastrointestinal toxicity associated proteins. The mechanism of Chinese herbal ingredients in Xinhuang Tablet on attenuating the gastrointestinal toxicity induced by indomethacin was explored on the gene level. **Results** Indomethacin could promote gastrin secretion, thus increasing gastric acid secretion and the vitality of pepsin. Xinhuang Tablet could significantly inhibit gastrin secretion, the activity of pepsin, and gastric acid secretion. Indomethacin could significantly inhibit the vitality of COX-1, while Xinhuang Tablet could increase the COX-1 vitality and further protect the gastric mucosa. Indomethacin could significantly up-regulate the gene expression of perforin, while down-regulate the gene expression of Mmp2 as well as the related protein genes of immune system and coagulation system. Compared with indomethacin, Xinhuang Tablet could significantly lower the expression of perforin gene, and raise the expression of Mmp2, Cldn1, the immune-related protein genes, coagulation factors, and fibrinogen. **Conclusion** These results indicated that the attenuating mechanism of Chinese herbal ingredients in Xinhuang Tablet on the

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 国家科技重大专项 (2012ZX09505001-001)

作者简介: 刘 静 (1980—), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向为药理毒理。E-mail: liuj@tjipr.com

*通信作者 申秀萍, 研究员, 从事药理毒理研究工作。E-mail: shenxp@tjipr.com

gastrointestinal toxicity of indomethacin might be related to the inhibition of gastrin secretion, improved vitality of inhibited COX-1 by indomethacin, down-regulate perforin, up-regulate Cldn1, immune-related protein genes, coagulation factors, fibrinogen, increase the membrane stability, and promote wound healing as well.

Key words: Xinhuang Tablet; indomethacin; gene chip; gastric ulcer; attenuation

新癩片是在古方八宝丹片仔癩的基础上研制而成的常用中成药,其主要组成为肿节风、三七、人工牛黄、肖梵天花、珍珠层粉、吡哌美辛等,具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛的功效,临床用于热毒瘀血所致的咽喉肿痛、牙痛、痹痛、胁痛、黄疸、无名肿毒等症。其化学药组分吡哌美辛为常用非甾体抗炎药,具有非甾体抗炎药常有的致胃肠道溃疡等不良反应,本课题组通过小鼠急性毒性试验比较新癩片与吡哌美辛的急性毒性作用,发现新癩片 LD₅₀ 为 1 217.83 mg/kg,用高效液相法测定新癩片原料粉(不含辅料)中含吡哌美辛 2.478%,折算成吡哌美辛的 LD₅₀ 为 30.16 mg/kg,而单用吡哌美辛的 LD₅₀ 为 18.31 mg/kg,二者比较差异非常显著,表明新癩片中中药成分对吡哌美辛有显著的减毒作用^[1]。本实验进一步研究新癩片中中药成分对吡哌美辛产生的胃肠毒性反应的减毒作用机制,为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品

新癩片,淡棕灰色片,含吡哌美辛 2.111%,批号 090505;吡哌美辛,质量分数 99.0%,白色粉末,批号 081201;均由厦门中药厂有限公司提供。

1.2 试剂

环氧化酶-1(COX-1)、环氧化酶-2(COX-2)、胃泌素 ELISA 测定试剂盒,Adlitteram Diagnostic Laboratories 生产;基因芯片类型为 Affymetrix Rat-2.0 microarray;分析软件为 dChip(Dec.2009 version)。基因芯片表达试剂盒, Affymetrix 公司; TRIzol Reagent, Invitrogen 生命技术公司;无核酶水, Ambion 公司;水,分子生物学级, Cambrex 公司;牛血清白蛋白(BSA), Invitrogen 生命技术公司;5 mol/L NaCl, Ambion 公司;MES 钠盐、EDTA 二钠、DMSO、山羊 IgG, Sigma-Aldrich 公司;聚山梨酯 20, Pierce Chemical 公司。

1.3 仪器

BIO—RAD 酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;DK 型电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;QZX—C 空气浴振荡器,哈尔滨市东明医疗仪器厂。

实验平台是 Affymetrix GeneChip 3000 TG System,具体包括:Scanner 3 000 7G 4C with Autoloader 芯片扫描仪,Scanner 3000 Workstation 扫描工作站,Fluidics Station 450 芯片洗涤工作站,Hybridization Oven 640 芯片杂交炉。

1.4 动物及饲养环境

SD 雄性大鼠,SPF 级,体质量 180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产单位许可证编号 SCXK(京)2007-0001。动物饲养在天津药物研究院实验动物屏障系统(津实动设施准第 012 号),实验动物使用许可证号:SYXK(津)2006-0002。

设施环境温度维持在 20~25 ℃,相对湿度维持在 40%~70%,通风次数为 10~15 次/h 全新风,光照为 12 h 明、12 h 暗。食用天津市华荣实验动物科技有限公司生产的大鼠全价营养块料,饮去离子水。

2 方法

2.1 对大鼠胃液分泌及胃蛋白酶活性的影响

选用 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组,分别为对照组(去离子水),新癩片 90、180 mg/kg(分别含吡哌美辛 1.9、3.8 mg/kg)组和吡哌美辛 1.9、3.8 mg/kg 组。大鼠分别 ig 给予相应剂量的新癩片及吡哌美辛,每日 1 次,连续给药 3 d。于末次给药当天各组随机挑选 8 只动物于给药后 40 min(实验前 1 d 禁食 24 h)戊巴比妥钠麻醉,仰位固定,腹部剃毛,腹部酒精棉球及碘酒消毒后,于剑突下沿正中中线剪一约 1 cm 切口,打开腹腔,用手术线结扎胃幽门及十二指肠连接处,缝合腹腔。术后禁食禁水。4 h 后 20%乌拉坦麻醉大鼠,剖开切口,结扎胃贲门,取出胃,沿胃大弯剖开,收集胃液,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,备用。

2.1.1 胃液分泌量、胃酸总酸度及胃酸分泌速度测定 将胃液上清液全部置于量筒中,读取数值,作为胃液分泌量。取上清液 0.5 mL 置小锥形瓶中,加入酚酞指示剂 1 滴,以 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液滴定至出现红色(颜色不再加深)为终点,按下面公式计算胃酸酸度及胃酸分泌速度,并计算新癩片中中药成分对吡哌美辛的抑制率。

胃酸酸度 = NaOH 浓度 × NaOH 体积 × 滴定所取胃液量 / 1 000

胃酸分泌速度 = 胃酸酸度 × 胃液总量 / 收集胃液时间

抑制率 = (吡哌美辛组数值 - 新癬片组数值) / (吡哌美辛组数值 - 对照组数值)

2.1.2 胃蛋白酶活性测定 取胃液 1.5 mL 加入 10 mL 的带塞玻璃瓶中, 放入 2.0 cm 长的麦氏蛋白管 2 根, 封好瓶口, 在 37 °C 恒温箱中孵育 20 h。取出蛋白管, 用游标卡尺测量蛋白管两端透明部分的长度, 以 4 端长度值求平均值, 按下面公式计算胃蛋白酶活性单位。

胃蛋白酶活性单位 = 平均值² × 16

2.2 对大鼠血清胃泌素的影响

动物分组、给药方法同“2.1”项, 于末次给药后 40 min (实验前 1 d 禁食 16 h) 戊巴比妥钠麻醉, 仰位固定, 腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, ELISA 法试剂盒测定胃泌素。

2.3 对大鼠血清 COX-1 和 COX-2 的影响

选用 SD 大鼠 100 只, 随机分为 5 组, 分别为对照组 15 只、新癬片 90 mg/kg (含吡哌美辛 1.9 mg/kg) 组 10 只、新癬片 180 mg/kg (含吡哌美辛 3.8 mg/kg) 组 25 只、吡哌美辛 1.9 mg/kg 组 10 只、吡哌美辛 3.8 mg/kg 组 40 只。大鼠分别 ig 给予新癬片及吡哌美辛, 每日 1 次, 连续给药 2 周。此时, 新癬片 180 mg/kg 组死亡 3 只, 吡哌美辛 3.8 mg/kg 组死亡 11 只。动物均死于肠穿孔, 吡哌美辛组动物可见少量轻度溃疡。于末次给药后 40 min (实验前 1 d 禁食 16 h) 各组取 10 只大鼠戊巴比妥钠麻醉, 仰位固定, 腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, ELISA 法测定试剂盒测定 COX-1、COX-2 活性。

2.4 对大鼠相关基因表达的影响

选用 SD 大鼠, 随机分为对照组、新癬片 180 mg/kg (含吡哌美辛 3.8 mg/kg) 组和吡哌美辛 3.8 mg/kg 组。大鼠分别 ig 给予新癬片及吡哌美辛, 每日 1 次, 给药 4 周。分别于第 2 周及第 4 周给药后 40 min (实验前 1 d 禁食 16 h) 戊巴比妥钠麻醉, 每组立即随机取肝脏 3 份, 液氮冷冻保存, 进行基因表达芯片检测。

2.4.1 提取 RNA 在液氮中将肝组织研磨成粉末, 待液氮挥发, 立即加入 TRIzol, 使样品充分裂解, 移入离心管中, 在离心管中加入 200 μL 氯仿, 振荡混匀, 并离心。用移液器吸出上层水相, 加入另一离心管中, 加入 500 μL 异丙醇, 室温沉淀。离心后

弃去上清。沉淀中加入 1 mL 75% 乙醇, 离心, 并重复 1 次。去上清, 室温晾干, 加入适当体积的 RNase-free 水, 充分溶解。

2.4.2 cDNA 的合成 对 RNA 进行纯化后, 利用 T7-(dT)₂₄ 做引物, 在反转录酶的作用下, 由 RNA 反转录成单链 cDNA, 42 °C 反应 2 h。以所合成的单链 cDNA 为模板, RNA 片段为引物, 在 DNA Polymerase 作用下合成双链 DNA, 并两端补平。16 °C 反应 1 h, 65 °C 反应 10 min。

2.4.3 aRNA 的合成和纯化 利用反转录过程中所加入的 T7 启动子, 在体系中加入 T7 转录酶进行转录扩增, 并同时产生的 aRNA 产物进行 Biotin 标记, 40 °C 反应 16 h。将合成的 aRNA 转入 aRNA 结合 Mix 中, 加入 120 μL 无水乙醇, 轻轻振荡 2 min。将该 1.5 mL 离心管转到磁力架上, 静置 5 min, 使磁珠吸附。弃上清。按下述方法清洗磁珠: 将离心管从磁力架上取出, 每管加入 100 μL RNA 洗液, 振荡 1 min; 将该 1.5 mL 离心管转到磁力架上, 静置 5 min, 使磁珠吸附; 弃上清, 将离心管从磁力架上取出; 重复 1 次, 然后按下述方法洗脱 aRNA: 加入预热 (50~60 °C) 的 aRNA 洗脱液, 振荡 3 min; 将该 1.5 mL 离心管转到磁力架上, 静置 5 min, 使磁珠吸附; 将上清转移到不含核酸酶的 PCR 管中。

2.4.4 aRNA 的定量和检测 用紫外分光光度计测定 aRNA 的浓度, 并计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 值, 变性胶检测 aRNA。取 1 μg aRNA 在 1.2% 的变性胶上电泳, 纯化的 aRNA 应该呈弥散状长条带。

2.4.5 芯片杂交 在 aRNA 片段化反应体系中 94 °C 温浴 35 min, 置于冰上。将片段化 aRNA 配入杂交液中, 在芯片中注入 200 μL 预杂交液, 将芯片放入杂交炉中, 45 °C、60 r/min 离心 10 min。将配制好的杂交 cocktail 放入 99 °C 温浴 5 min, 将 cocktail 从 99 °C 转入 45 °C 温浴 5 min, 将 cocktail 放入离心机中, 最大转速离心 5 min。在芯片中注入 200 μL cocktail, 将芯片放入杂交炉中, 45 °C, 60 r/min 离心 16 h。

2.4.6 洗脱芯片 在洗涤工作站 FS450 上, 运行洗脱程序, 对芯片进行清洗、染色和信号放大过程。

2.4.7 扫描芯片 用 Scanner 3000 7G 4C 扫描仪对芯片进行扫描和信号值转换。

2.5 数据处理

基因表达芯片检测数据采用 dChip (Dec.2009

version)分析软件 lower bound fold change 方法分析表达差异 1.5 倍以上基因 (fold 值, 药物组与对照组比值), 其余实验数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计软件 SPSS 11.5 (One-way ANOVA: LSD) 进行检验。

3 结果

3.1 对大鼠胃液分泌及胃蛋白酶活性的影响

与对照组比较, 吲哚美辛能显著增加胃蛋白酶活力, 增加胃液分泌量、胃酸总酸度、胃酸分泌速

度。与相当剂量的吲哚美辛比较, 180 mg/kg 新癍片对胃蛋白酶活性有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 180、90 mg/kg 新癍片对吲哚美辛引起的胃酸分泌速度增加有显著的抑制作用, 其抑制率分别达 71.6%、57.2%; 对吲哚美辛引起的胃液酸度增加有一定的抑制作用, 抑制率达 54.1%、34.1%。结果提示新癍片中药成分能抑制吲哚美辛引起的胃蛋白酶活性及胃酸的分泌速度增加, 抑制胃酸过多分泌, 见表 1。

表 1 新癍片和吲哚美辛对大鼠胃液分泌及胃蛋白酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of Xinhuang Tablet and indomethacin on secretion of gastric juice and pepsin activity of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	分泌胃液量 / mL	胃液酸度 / (mmol·L ⁻¹)	胃酸分泌速度 / (mmol·h ⁻¹)	胃蛋白酶活性单位
对照	—	4.3 ± 1.6	44.5 ± 24.7	0.046 ± 0.027	104 ± 14
新癍片	90	5.2 ± 1.4	70.4 ± 12.5 ^{***}	0.091 ± 0.027 ^{**}	228 ± 117 [*]
	180	4.6 ± 1.8	60.6 ± 18.9 ^{***}	0.075 ± 0.048	151 ± 173 ^{△△}
吲哚美辛	1.9	7.0 ± 2.6 [*]	83.8 ± 23.4 ^{***}	0.151 ± 0.080 ^{**}	359 ± 136 ^{**}
	3.8	7.1 ± 2.7 [*]	79.6 ± 34.0 ^{***}	0.149 ± 0.102 [*]	481 ± 134 ^{***}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与相当剂量的吲哚美辛组比较: △ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; △ $P < 0.01$ vs considerable dose of indomethacin

3.2 对大鼠血清胃泌素的影响

与对照组比较, 吲哚美辛高剂量组可显著促进胃泌素分泌, 与相当剂量吲哚美辛比较, 新癍片高剂量组显著抑制胃泌素分泌 ($P < 0.01$)。提示新癍片中药成分能显著抑制吲哚美辛引起的胃泌素分泌增加, 见表 2。

3.3 对大鼠血清 COX-1 和 COX-2 的影响

与对照组比较, 吲哚美辛高剂量组可显著抑制 COX-1 活性, 升高 COX-2 活性。而与吲哚美辛比较, 新癍片高剂量组可以增加 COX-1 活性 ($P < 0.05$ 、0.01), 抑制 COX-2 活性 ($P < 0.01$)。结果显示新癍片中药成分能显著升高被吲哚美辛抑制的 COX-1 活性, 显著抑制 COX-2 活性, 见表 2。

3.4 对大鼠相关基因表达的影响

与对照组比较, 吲哚美辛能显著下调基质金属蛋白酶 2 (Mmp2) 表达, 给药早期吲哚美辛能显著上调穿孔蛋白 1 (Prf1) 基因表达, 随着给药时间延长, 吲哚美辛能显著下调免疫系统及凝血系统相关蛋白基因表达。与吲哚美辛比较, 新癍片能显著上调 Mmp2 表达, 显著上调紧密连接蛋白 1 (Cldn1) 表达; 给药 2 周能显著下调 Prf1 基因表达, 给药 4 周能显著上调免疫系统及凝血系统相关蛋白基因表达。结果表明, 新癍片中药成分能显著上调 Mmp2 表达, 改善吲哚美辛引起的胃肠黏膜溃疡, 这可能与显著下调 Prf1 基因表达, 上调 Cldn1 表达, 改善细胞通透性, 加强细胞紧密连接有关, 以及上调免疫系统及凝血系统相关蛋白基因表达, 改善免疫及凝血系统有关。见表 3。

表 2 新癍片和吲哚美辛对大鼠血清胃泌素、COX-1、COX-2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Xinhuang Tablet and indomethacin on gastrin, COX-1, and COX-2 in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	胃泌素 / (ng·mL ⁻¹)	COX-1 / (ng·mL ⁻¹)	COX-2 / (ng·mL ⁻¹)
对照	—	0.744 ± 0.201	11.961 ± 3.369	6.730 ± 2.624
新癍片	90	0.767 ± 0.194 ^{△△}	11.415 ± 2.920 ^{△△}	12.325 ± 3.174 ^{△△△}
	180	1.019 ± 0.186 ^{***△△}	9.742 ± 2.205 [△]	23.369 ± 6.728 ^{***△△△}
吲哚美辛	1.9	1.318 ± 0.512 ^{**}	7.888 ± 1.677 ^{**}	24.801 ± 5.347 ^{***}
	3.8	1.620 ± 0.450 ^{***}	7.702 ± 0.781 ^{**}	40.105 ± 9.375 ^{***}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与相当剂量吲哚美辛组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ △△△ $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ △△△ $P < 0.001$ vs considerable dose of indomethacin

表 3 差异表达基因谱
Table 3 Differential expression of gene spectra

功能系统	探针	基因	吲哚美辛 fold 值		新癆片 fold 值	
			2 周	4 周	2 周	4 周
	1370096_at	Prf1: perforin 1 (pore forming protein)	1.90	-1.83	1.42	-1.05
	1369825_at	Mmp2: matrix metalloproteinase 2	-2.18	-2.96	-1.33	-1.67
	1396150_at	Cldn1: claudin 1	1.11	1.19	2.19	2.35
	1387470_at	Cldn1: claudin 1	1.41	-1.25	2.44	2.69
	1383946_at	Cldn1: claudin 1	1.62	1.35	2.64	3.27
免疫系统	1368000_at	C3: complement component 3	-1.19	-61.7	1.02	-1.36
	1368205_at	Cfi: complement factor I	-1.17	-66.0	-1.03	-1.41
	1371079_at	Fcgr2b: Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1.00	-28.7	1.14	-1.51
	1387868_at	Lbp: lipopolysaccharide binding protein	1.24	-15.4	1.74	1.57
	1389470_at	Cfb: complement factor B	-1.04	-43.1	1.04	-1.43
	1381006_at	Hgfac: hepatocyte growth factor activator	1.04	-30.8	-1.01	-1.65
	1383391_a_at	C2: complement component 2	1.09	-11.1	1.23	-1.36
	1393123_at	C8g: complement component 8, gamma polypeptide	-1.11	-27.3	1.06	-1.36
凝血系统	1368442_at	F2: coagulation factor II (thrombin)	-1.24	-60.0	-1.02	-1.46
	1370511_at	Fgb: fibrinogen beta chain	-1.17	-111.0	-1.06	-1.52
	1371258_at	Fga: fibrinogen alpha chain	-1.46	-39.9	-1.18	-1.71
	1387270_at	Hhex: hematopoietically expressed homeobox	1.16	-11.2	1.02	-1.25

4 讨论

吲哚美辛等非甾体抗炎药 (NSAIDs) 是一类具有抗炎、镇痛作用的药物, 其临床应用广泛。但长期大量服用容易引起对胃肠道的损害, 可引起消化不良、胃肠道黏膜糜烂、消化性溃疡和出血, 甚至危及生命。研究表明吲哚美辛等 NSAIDs 引起胃溃疡的机制主要与其抑制环氧化酶, 减少前列腺素 (PG) 生成及对胃肠黏膜的直接损伤作用有关^[2-4]。

本课题组研究发现, 大鼠 ig 给药 1 个月长期毒性试验中, 高剂量的吲哚美辛给药 1 个月后动物死亡率达 71.4%, 死亡原因为肠穿孔。与吲哚美辛比较, 新癆片高剂量 (含有相同剂量吲哚美辛) 动物死亡数明显减少, 死亡率为 26.2%, 血液学各指标基本正常。显示新癆片中药成分对吲哚美辛引起大鼠胃溃疡有显著的保护作用, 表明新癆片中药成分对吲哚美辛的胃肠毒性有明显的减毒作用。

为了进一步研究新癆片中药成分对吲哚美辛的减毒作用机制, 本实验对吲哚美辛、新癆片对大鼠血清胃泌素水平, 血清 COX-1、COX-2 活性及胃蛋白酶活性和胃酸分泌的影响进行了研究。COX-1 表达于多种正常组织中, COX-2 在大多数正常组织中

无表达或表达极微弱, 在炎症部位则表达显著增加。在维持正常胃肠道黏膜完整性方面起关键作用的 PG 主要是 COX-1 衍生物。吲哚美辛同时抑制 COX-1 和 COX-2, 使内源性 PG 合成受阻, 胃肠道黏膜中 PG 的量减少, 保护作用削弱, 导致胃肠道黏膜对外来攻击因子的防御能力降低。因此在吲哚美辛致胃黏膜病变的发病机制中, 抑制 COX-1 活性为关键因素之一。本研究中, 吲哚美辛可显著抑制 COX-1 活性, 而与吲哚美辛比较, 新癆片高剂量组可以升高 COX-1 活性, 对胃肠黏膜的保护作用增强。本研究还发现高剂量的吲哚美辛并未抑制 COX-2 活性, 而是引起 COX-2 活性升高, 这可能与吲哚美辛致胃溃疡后形成炎症, 导致 COX-2 活性增加有关, 而与吲哚美辛比较, 新癆片可选择性抑制 COX-2 活性, 从而加强其抗炎作用。

经进一步研究表明, 吲哚美辛能引起胃蛋白酶活性增加、胃酸分泌增多, 这可能与促进胃泌素分泌有关。新癆片能显著抑制胃泌素分泌, 显著抑制吲哚美辛引起的胃蛋白酶活性增加, 对胃酸分泌增加有一定的抑制作用, 显示新癆片中药成分对吲哚美辛胃肠毒性的减毒作用机制可能与新癆片中药

成分能抑制胃泌素分泌,从而抑制胃蛋白酶活性,抑制胃酸分泌有关。

给药时间短,动物仅仅出现胃酸分泌增多的现象,为了更好地研究新癍片中药成分对吡哌美辛引起的胃肠溃疡、穿孔从而导致动物死亡的减毒作用,在进行基因芯片检测时,延长了实验时间,以新癍片出现少量死亡为准,从而便于研究新癍片中药成分对吡哌美辛引起动物肠穿孔死亡的保护作用的机制。通过基因表达芯片检测,本研究发吡哌美辛能显著下调 Mmp2 基因表达,与文献一致^[5]。吡哌美辛诱导胃肠溃疡涉及活性氧的产生和减少基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的转录和翻译,这一作用可以被抗氧化剂扭转。而新癍片能显著抑制吡哌美辛引起的 Mmp2 表达下调,表明新癍片中药成分能显著减轻吡哌美辛引起的胃肠溃疡。

通过基因表达芯片检测,本研究发现了吡哌美辛能显著上调 Prf1 基因表达,对 Cldn1 无显著性影响。而 Prf1 基因的作用是在靶细胞膜上形成多聚穿孔素管状通道,导致靶细胞溶解破坏^[6]。在 Ca^{2+} 存在下,插入靶细胞膜上,并多聚化形成管状的多聚穿孔素,多聚穿孔素在靶细胞膜上形成穿膜的管状结构,内径平均 16 nm。这种异常的通道使 Na^+ 、水分进入靶细胞内, K^+ 及大分子物质(如蛋白质)从靶细胞内流出,改变细胞渗透压,使细胞更容易被破坏。吡哌美辛引起肠穿孔可能与之有关;与吡哌美辛比较,新癍片的 Prf1 基因表达显著下调, Cldn1 显著上调。新癍片中药成分能显著下调 Prf1 基因表达,上调 Cldn1 基因表达可能是其对吡哌美辛胃肠功能毒性的减毒作用机制之一。Claudin 蛋白是构成细胞膜紧密连接至关重要的成分,紧密连接具有将细胞联成整体的机械作用,加强细胞间的连接,使细胞不易受破坏^[7-9]。对肠道系统疾病的研究发现, TNF- α 可以破坏 Claudin 1 的结构,从而破坏紧密连接,肠道渗透性增强,最终导致炎性肠病的发生。新癍片能显著上调 Cldn1 基因表达,加强细胞膜紧密连接,从而保护胃肠黏膜细胞。

通过基因表达芯片检测,本研究还发现吡哌美辛能显著下调免疫、凝血系统相关蛋白基因表达,影响机体伤口修复功能,而新癍片中药部分能上调

免疫相关蛋白基因表达,提高机体免疫力,上调凝血因子、纤维蛋白原表达,改善凝血功能,促进伤口修复,可能是其对吡哌美辛胃肠毒性的减毒作用机制之一。

本实验研究发现新癍片中药成分对吡哌美辛胃肠毒性有显著的减毒作用,其机制与新癍片中药成分提高 COX-1 活性,保护胃黏膜;抑制胃泌素分泌,从而减少胃酸分泌及抑制胃蛋白酶活性,减少胃肠黏膜的损伤有关,并可能与上调 Cldn1、下调 Prf1 基因表达、上调免疫系统及凝血系统相关蛋白基因表达有关。本研究也为进一步研究新癍片中药成分治疗吡哌美辛等 NSAIDs 引起的胃肠溃疡提供理论依据。

参考文献

- [1] 胡金芳,刘静,申秀萍.新癍片中药组分对吡哌美辛的减毒作用[J].现代药物与临床,2010,25(3):204-206.
- [2] 吴炜烽,吕斌.非甾体抗炎药及其相关胃肠疾病[J].胃肠病学,2007,12(10):634-636.
- [3] 张彭,王孟春.非甾体抗炎药致胃肠道黏膜损伤的研究进展[J].实用药物与临床,2008,11(6):378-380.
- [4] Tugendreich S, Pearson C I, Sagartz J, et al. NSAID-induced acute phase response is due to increased intestinal permeability and characterized by early and consistent alterations in hepatic gene expression [J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(2): 168-179.
- [5] Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, et al. Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants [J]. *Free Rad Biol Med*, 2006, 47(6): 911-925.
- [6] 王立锋.穿孔素基因的克隆、表达及其凋亡诱导活性研究[D].西安:第四军医大学,2008.
- [7] 陈磊,葛霞. claudin 的研究进展 [J]. 蚌埠医学院学报, 2007, 32(4): 498-499.
- [8] 张志强,王燕庆,董明,等.氧化苦参碱诱导跨膜蛋白 Claudin-1 表达在重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜损害中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(5): 510-514.
- [9] 崔巍,刘冬妍,马力,等. TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(16): 1788-1793.