

表2 川芎嗪对 VEGF 诱导的 ECV304
细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of TMP on proliferation of ECV304
induced by VEGF ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	大鼠血清/%	cpm 值	A 值
NS	—	3 625.34 ± 315.58	0.621 ± 0.008
VEGF	—	10 694.68 ± 537.25*	0.963 ± 0.009*
VEGF+空白血清	20	7 197.07 ± 169.92**	0.924 ± 0.004*
	10	8 052.76 ± 65.19*	0.933 ± 0.014
	5	9 821.82 ± 128.05	0.964 ± 0.004
VEGF+TMP (143 mg/kg)	20	5 405.45 ± 140.90**△	0.717 ± 0.003**△
	10	5 024.48 ± 100.57**△	0.712 ± 0.004**△
	5	5 760.46 ± 49.64**△	0.726 ± 0.004**△
VEGF+TMP (71.5 mg/kg)	20	5 720.09 ± 279.03**△	0.693 ± 0.006**△
	10	7 526.47 ± 169.21**	0.703 ± 0.005**△
	5	10 754.90 ± 176.96*	0.953 ± 0.007

与 NS 组比较: * $P < 0.01$; 与 VEGF 组比较: * $P < 0.05$

** $P < 0.01$; 与相应的空白血清对照组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.01$ vs NS group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs VEGF
group; △ $P < 0.05$ vs corresponding blank serum group

外培养的内皮细胞生长^[4],但其是否能抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞的增殖尚无报道。本实验表明川芎嗪能抑制血管内皮细胞的增殖,同时亦能抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞增殖。这可能是其抑制血管生成的机制之一。川芎嗪抑制血管内皮细胞增

殖的机制可能为:①钙离子阻滞作用^[5,6]。②抑制细胞黏附分子^[7]。③对某些参与血管内皮细胞增殖、血管生成过程调控的生长因子的对抗或协同作用。川芎嗪抑制血管内皮细胞增殖的确切机制尚有待进一步研究。

References:

- [1] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors [J]. *Science*, 1987, 235(4787): 442-447.
- [2] Connolly D T, Heuvelman D M, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 1989, 84(5): 1470-1478.
- [3] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele [J]. *Nature*, 1996, 380(6573): 435.
- [4] Zhou W D, Pan M X, He H B, et al. Effects of Tramethylpyrazine and Aspirin on endothelial cell in culture [J]. *Acad J First Med Coll PLA* (第一军医大学学报), 1992, 12(1): 52-53.
- [5] Stephanie T, Judah F. Protamine is an inhibitor of angiogenesis [J]. *Nature*, 1982, 297(5864): 307-312.
- [6] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB J*, 1999, 13(1): 9-22.
- [7] Zeng S Y, Fan S X, Jiang X Q. Inhibitory effects of Ligustrazine on the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells induced by preeclamptic plasma [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2000, 35(5): 282-284.

引流熊胆的抗溃疡作用

洪雪梅¹, 金春玉², 朴世浩²

(1. 吉林省延边第二人民医院 内科, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林省延边大学医学院 药理教研室, 吉林 延吉 133000)

熊胆 (bear bile) 为熊科动物黑熊 *Selenarctor thibetanus* G. Curier 或棕熊 *Ursus arctor* Linnaeus 的干燥胆汁。习以杀熊取胆,但近年国内广泛采用导管活体引流熊胆汁再经干燥而制得,称引流熊胆。熊胆为我国稀有珍贵中药材之一,具有利胆溶石、抗炎、解热、镇痛、扩冠、降压、调血脂等药理作用^[1~3],临床用于治疗多种疾病,且毒性低、副作用少,有很高的应用价值。目前尚未见有关引流熊胆对实验性胃溃疡作用的研究报道。本研究观察引流熊胆对大鼠急、慢性实验性胃溃疡的防治作用,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物:Wistar 大鼠,体重 200~250 kg,雌雄兼

用,由延边大学医学院实验动物科提供。

1.2 药品:干燥引流熊胆 (含牛黄去氧胆酸 42.8%),由延边经济动物研究所提供,临用时用蒸馏水配制。甲氰咪胍 (Cimetidine, CT),上海第一制药厂生产,批号 970505,临用时用蒸馏水配制。利血平注射液,上海医科大学红旗制药厂生产,批号 960313。消炎痛粉,沈阳市第五制药厂生产,临用时溶于 5% NaHCO₃ 溶液,再用蒸馏水稀释。五肽胃泌素,美国 Sigma 公司产品。

2 方法与结果

2.1 对大鼠醋酸型胃溃疡的影响:取大鼠 40 只,雌雄不拘,随机分为模型组、CT (0.2 g/kg) 组和引流熊胆 0.05、0.1、0.2 g/kg 组。按文献方法^[4]将

收稿日期:2004-01-11

作者简介:洪雪梅(1970—),女(朝鲜族),吉林省延吉市人,吉林省延边大学医学院药理学硕士,现任吉林省延边第二人民医院内科主治医师。Tel: (0433) 2911153

30% 醋酸溶液 0.02 mL 注射至腺胃部前壁浆膜下。术后第2天开始每天上午8点和下午5点各ig给药1次,共给药10 d。第11天将大鼠脱颈椎处死,剖腹,结扎贲门和幽门后取胃,向胃内注入1%甲醛溶液10 mL,将胃浸泡于1%甲醛溶液中固定15 min,沿胃大弯剪开胃,测量溃疡灶的横径和竖径,以二者乘积(mm^2)作为溃疡指数,并计算溃疡抑制率,结果见表1。引流熊胆各剂量组的溃疡指数均降低,与模型组比较差异显著($P<0.05, 0.01$),提示引流熊胆对醋酸型胃溃疡有明显的促进愈合作用。

溃疡抑制率=(对照组溃疡指数-给药组溃疡指数)/对照组溃疡指数 $\times 100\%$

表1 引流熊胆对大鼠醋酸型胃溃疡的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of bear bile on acetic acid-induced gastric ulcer in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	溃疡指数/mm 2	溃疡抑制率/%
模型	—	23.4 $\pm$ 14.7	—
CT	0.20	7.3 $\pm$ 7.2*	68.8
引流熊胆	0.05	14.9 $\pm$ 14.0	36.3
	0.10	4.6 $\pm$ 4.4**	80.3
	0.20	1.0 $\pm$ 2.7**	95.7

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

2.2 对大鼠消炎痛型胃溃疡的影响:大鼠30只,雌雄不拘,随机分为模型组、引流熊胆0.1、0.2 g/kg组。前3 d每天上午8点和下午5点各ig给药1次,第4次给药后开始禁食36 h,自由饮水,第4天早晨给药(共给药7次)后30 min,给大鼠ip消炎痛40 mg/kg,5 h后脱颈椎处死。大鼠处死后的处理同2.1项方法,按文献方法^[5]并略加改进,将溃疡程度划分为6个等级作为溃疡指数:完整黏膜为0级;点状出血(直径 ≥ 1 mm),1~5点为1级;6~10点为2级;10点以上为3级;条状出血,1~5条为4级;6~10条为5级;10条以上为6级(条状出血直径 ≤ 1 mm计1条,1 mm<直径 ≤ 2 mm计2条,2 mm<直径 ≤ 3 mm计3条,以此类推),结果见表2。引流熊胆能明显减轻消炎痛所致的胃黏膜损

表2 引流熊胆对大鼠消炎痛型胃溃疡的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of bear bile on indomethacin-induced gastric ulcer in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	溃疡指数	溃疡抑制率/%
模型	—	3.73 $\pm$ 0.79	—
引流熊胆	0.1	3.20 $\pm$ 1.03	14.2
	0.2	2.30 $\pm$ 1.34**	38.3

与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group

伤,0.2 g/kg剂量组与模型组相比差异非常显著($P<0.01$)。

2.3 对大鼠应激型胃溃疡的影响:分组与给药剂量同2.2项。每天ig给药2次,共3 d,末次给药后1 h,在轻度乙醚麻醉下将大鼠四肢绑于铁网上,倒挂15 h后断头处死^[6]。大鼠处死后的处理同2.1项,溃疡指数评分方法同2.2项。结果表明模型组、引流熊胆0.1、0.2 g/kg组的溃疡指数($\bar{x}\pm s, n=8$)分别为3.6 $\pm$ 1.3、3.5 $\pm$ 1.4和3.0 $\pm$ 1.5。引流熊胆两个剂量组与模型组比较差异均不显著($P>0.05$)。说明引流熊胆对大鼠应激型胃溃疡无明显对抗作用。

2.4 对大鼠幽门结扎型胃溃疡的影响:分组与给药剂量同2.2项。每天ig给药2次,共13次,第9次给药后禁食、不禁水48 h。末次给药后2 h,按文献方法^[7]在乙醚麻醉下开腹,结扎幽门和十二指肠结大部。术后禁食、禁水12 h,然后脱颈椎处死。剖腹取胃,收集胃液,测胃液总酸度和游离酸度、胃壁黏液量、胃蛋白酶活性,并按溃疡面积的大小和数量的多少将损伤划分为5个等级作为溃疡指数^[8]:无溃疡为0级;1~3个小溃疡(3 mm 2 以下)为1级;3个以上小溃疡或1个大溃疡(3 mm 2 以上)为2级;1个大溃疡和几个小溃疡为3级;2个或2个以上大溃疡为4级;穿孔性溃疡为5级,结果见表3。引流熊胆两个剂量组与模型组比较差异不显著($P>0.05$)。引流熊胆对胃游离酸度、胃液总酸度、胃蛋白酶活性和胃壁黏液量均无显著影响($P>0.05$)。

2.5 对大鼠无水乙醇型胃溃疡的影响:分组与给药剂量同2.2项。每天ig给药2次,共13次,末次给药前严格禁食48 h,末次给药后30 min每只大鼠ig无水乙醇1.2 mL,1 h后脱颈椎处死^[9]。处死后处理方法同2.1项,溃疡指数评分方法同2.2项,结果见表4。引流熊胆能明显减轻无水乙醇所致的胃黏膜损伤,两个剂量组与模型组相比差异均极显著($P<0.001$)。

2.6 对大鼠利血平型胃溃疡的影响:分组与给药剂量同2.2项。每天ig给药2次,共3 d,第4次给药后开始禁食43 h,末次给药后1 h ip利血平5 mg/kg,18 h后脱颈椎处死^[7]。处死后处理方法及溃疡指数评分同2.1项。模型组、引流熊胆0.1、0.2 g/kg组溃疡指数($\bar{x}\pm s, n=8$)分别为(35.49 $\pm$ 26.23)、(43.00 $\pm$ 32.50)和(56.98 $\pm$ 38.13) mm 2 。引流熊胆两个剂量组与模型组比较差异并不显著($P>0.05$)。说明引流熊胆对大鼠利血平型胃溃疡无对抗作用。

表 3 引流熊胆对大鼠幽门结扎型胃溃疡的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of bear bile on pyloric ligation-induced gastric ulcer in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g · kg ⁻¹)	动物数 /只	溃疡指数	动物数 /只	胃液游离酸度 (mmol · L ⁻¹)	胃液总酸度 (mmol · L ⁻¹)	胃壁黏液量 /mg	动物数 /只	胃蛋白酶活性 (U · mL ⁻¹)
模型	—	10	3.22 ± 1.20	7	33.4 ± 27.5	118.6 ± 54.8	2.20 ± 0.42	5	176.39 ± 53.21
引流熊胆	0.1	10	3.80 ± 0.63	6	27.4 ± 37.7	107.0 ± 21.5	2.49 ± 0.20	5	143.78 ± 64.73
	0.2	10	3.50 ± 1.08	6	62.8 ± 34.3	126.0 ± 19.6	2.47 ± 0.24	6	192.29 ± 33.99

表 4 引流熊胆对大鼠无水乙醇型胃溃疡的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)Table 4 Effect of bear bile on alcohol-induced gastric ulcer in rats ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	溃疡指数	溃疡抑制率/%
模型	—	4.43 ± 0.49	—
引流熊胆	0.1	1.60 ± 1.28***	63.9
	0.2	0.60 ± 0.49***	86.5

与模型组比较: *** $P < 0.01$ *** $P < 0.01$ vs model group

2.7 对大鼠五肽胃泌素型胃溃疡的影响: 分组与给药剂量同 2.2 项。每天 ig 给药 2 次, 共 9 次, 于第 5 次给药后禁食 48 h, 第 5 日晨末次给药后 1 h ip 五肽胃泌素 0.12 mg/kg, 注射后禁水。30 min 后在乙醚麻醉下行幽门结扎术。6 h 后脱颈椎处死。剖腹取胃, 在近幽门处剪一小口, 小心收集胃液, 之后结扎此切口。溃疡指数的评分方法同 2.6 项。记录胃液量, 并测定胃酸度, 结果见表 5。引流熊胆对胃液量、胃酸度影响不大, 两个剂量组与模型组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。说明引流熊胆对五肽胃泌素型胃溃疡无对抗作用。

表 5 引流熊胆对大鼠五肽胃泌素型胃溃疡的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)Table 5 Effect of bear bile on pentagastrin-induced gastric ulcer in rats ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量 (g · kg ⁻¹)	溃疡指数 /mm ²	胃液量 (mL · 100g ⁻¹)	胃液游离酸度 (mmol · L ⁻¹)	胃液总酸度 (mmol · L ⁻¹)
模型	—	7.54 ± 8.99	7.55 ± 2.89	102.25 ± 18.90	169.13 ± 20.92
引流熊胆	0.1	15.37 ± 16.30	8.46 ± 1.09	98.88 ± 19.57	163.25 ± 17.50
	0.2	25.09 ± 41.70	6.61 ± 2.62	75.86 ± 30.49	138.14 ± 22.64

3 讨论

实验结果表明, 引流熊胆对醋酸型、消炎痛型和无水乙醇型胃溃疡均有明显的对抗作用, 对应激型、利血平型、幽门结扎型和五肽胃泌素型胃溃疡无对抗作用, 对胃液量、胃酸度、胃蛋白酶活性和胃壁黏液量无显著影响。

消化性溃疡的发病原因十分复杂, 各种溃疡模型的发病机制亦尚未完全阐明。一般认为其发病基础是胃酸、胃蛋白酶分泌过多, 黏膜的抵抗力减弱, 或两者兼存。醋酸型胃溃疡的形成主要是由于醋酸

直接损伤胃壁组织并引起血液循环障碍^[6,10]。引流熊胆对醋酸型胃溃疡疗效显著, 能明显促进溃疡灶的愈合, 使溃疡灶缩小、变浅, 说明引流熊胆有改善溃疡灶局部血液循环, 促进受损胃黏膜修复愈合的作用。无水乙醇型胃溃疡的形成主要与其抑制 DNA、RNA 和蛋白质合成有关^[11]; 消炎痛型胃溃疡的发病机制主要是抑制胃黏膜环氧化酶, 使前列腺素合成减少, 致胃黏膜细胞屏障机能减弱, 胃酸增高而诱发溃疡^[8]。引流熊胆对无水乙醇型及消炎痛型胃溃疡均有明显的对抗作用, 提示促进 DNA、RNA 与蛋白质及前列腺素的合成, 增强胃黏膜细胞保护作用为引流熊胆的重要抗溃疡作用机制。应激型胃溃疡的发病机制比较复杂, 但主要是皮层中枢的兴奋及抑制过程失调, 经交感神经引起血管平滑肌收缩, 使胃黏膜血流量降低, 经迷走神经使胃壁痉挛, 加重微循环障碍, 造成能量代谢障碍、胃腔内酸碱平衡失调、脂质过氧化反应增强、氧自由基产生增多, 从而导致严重的胃黏膜损伤^[10], 引流熊胆不能对抗应激型胃溃疡的形成, 说明其抗溃疡作用可能与抗自由基、抑制脂质过氧化反应无关。利血平型胃溃疡是一种酸依赖性溃疡, 其发病机制可能与迷走神经兴奋性提高, 导致胃液分泌增多胃黏膜缺血有关^[8]。幽门结扎型胃溃疡的发生主要是使胃液滞留, 使致溃疡因素增强而形成的^[10]。引流熊胆对这两种溃疡及五肽胃泌素型溃疡均无效, 说明引流熊胆不能对抗酸依赖型胃溃疡的形成。胃液分析结果表明, 引流熊胆对幽门结扎型胃溃疡的胃酸度、胃蛋白酶活性无明显影响, 这进一步证明引流熊胆不能对抗酸依赖型胃溃疡的形成。

本研究表明引流熊胆对醋酸型、消炎痛型和无水乙醇型胃溃疡有明显的防治作用, 其作用机制可能主要与通过改善黏膜血液循环, 促使受损胃黏膜修复愈合, 促进 DNA、RNA 和蛋白质的合成、抑制胃蛋白酶的分泌以及增加前列腺素的合成等对胃黏膜细胞产生保护作用的因素有关。

References:

- [1] Shen Y, Lin S J. Research progress of bear bile [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1992, 8(4): 46-48.

- [2] Kang G Z, Pan X M, Li B, *et al.* Study on the pharmacology of cholelithiasis prevented and cured with Composite Xiong-dan Capsule [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 1996, 3(5): 20-21.
- [3] Jin Z N, Shun D Z, Liang C Y, *et al.* Effects of bear bile injection on blood lipid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(4): 216-218.
- [4] Takagi K. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1969, 19: 418.
- [5] Zhang S R, Shao J Y, Yu Y W, *et al.* The Protective effects of furazolidone and some commonly used antiulcer drugs on several gastric ulcer models in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1984, 19(1): 5-11.
- [6] Wang B X, Liu A J, Cheng X J, *et al.* Antiulcer action of the polysaccharides isolated from pilose antler [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1985, 20(5): 321-325.
- [7] Shay H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat [J]. *Gastroenterology*, 1945, 5: 43-61.
- [8] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.
- [9] Robera A. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypotonic NaCl, and thermal injury [J]. *Gastroenterology*, 1979, 77: 433-443.
- [10] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- [11] Miller T A. Prostaglandin E₂ prevents alterations in gastric mucosal DNA, RNA and protein induced by alcohol [J]. *Gastroenterology*, 1980, 78: 1223.

苦瓜素对小鼠柯萨奇 B₃病毒性心肌炎的治疗作用

李双杰¹, 王 佐¹, 张召才², 陈瑞珍², 杨英珍², 陈灏珠², 葛均波²

(1. 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001; 2. 复旦大学附属中山医院 上海市心血管病研究所, 上海 200032)

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 是常见的获得性心肌疾病之一, 近年来发病率逐年上升, 成为青少年猝死的重要原因, 严重危害人类健康, 但目前尚无有效的抗病毒药物治疗。苦瓜为葫芦科属植物苦瓜 *Momordica charantia* L. 的果实, 已有数百年的药食两用史。最近国内外学者从苦瓜果肉、种仁中分离纯化出多种有效成分, 发现有明显的抗病毒、抗肿瘤、调节免疫等多种功效, 具有很高的药用价值^[1]。笔者从苦瓜果肉中分离纯化一种相对分子质量为 2.8×10^4 的蛋白质有效成分, 称之为苦瓜素 (momordicin), 在体外有明显的抗亲心性柯萨奇 B₃ 病毒 (coxsackievirus B₃, CVB₃) 的作用^[2], 本实验观察苦瓜素治疗实验性小鼠 CVB₃ 病毒性心肌炎的疗效。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 4 周龄、雄性、纯种 BALB/C 小鼠, 体重 10~12 g, 复旦大学动物实验部提供, 饲养于 SPF 级环境中。

1.2 病毒: CVB₃ (Nancy 株) 在 HeLa 细胞中传代, 冻融离心 3 次, 上清液分装, 在 HeLa 细胞上测 50% 组织感染率 (TCID₅₀) 为 1×10^{-7} 。-70 °C 保存备用。

1.3 苦瓜素: 选择湖南省衡阳市郊区廖家湾村种植的新鲜成熟苦瓜, 去籽压汁, 乙醇分级沉淀, 凝胶过滤色谱分离, 离子交换色谱分离, 低温真空干燥制备^[2], 采用高效液相色谱法进行质量控制。苦瓜素纯度 $\geq 95\%$ 为合格。用生理盐水配制成 3% 溶液, 0.22 μ m 过滤器滤过除菌, 4 °C 保存备用。

1.4 模型制备及给药: 80 只小鼠分别 ip 含 1×10^5 TCID₅₀ CVB₃ 的 PRMI-1640 液 0.1 mL 建立心肌炎实验模型。随机分为 4 组, 每组 20 只。苦瓜素高、中、低剂量 (60、20、5 mg/kg) 组, 在接种病毒 30 min 后, ip 给药, 每日 1 次, 共 7 d; 模型组, 在接种病毒 30 min 后, ip 生理盐水 0.1 mL, 每日 1 次, 共 7 d。

1.5 生存率测定: 各组取 15 只小鼠连续观察 14 d, 每日清点小鼠生存数, 计算病毒感染后 14 d (急性期) 小鼠生存率。

1.6 心肌病毒滴度测定: 感染后第 8 天各组取 5 只小鼠, 处死后无菌取出心脏, 取心房与右心室部分, 置无菌 PBS 液 1 mL 内, 捣碎。1 500 r/min, 离心 5 min, 取上清液于 -20 °C 冻存备用。按病毒的细胞致病变效应实验 (微量试验法) 于单层 HeLa 细胞上测定其组织培养半数感染量 (TCID₅₀)。

1.7 心肌组织中 CVB₃ RNA 定量检测: 取 1.6 项

收稿日期: 2004-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070934); 湖南省中医药科研项目 (96050)

作者简介: 李双杰 (1961—), 男, 苗族, 湖南省绥宁人, 副教授, 博士后, 研究生导师, 主要从事病毒性心肌疾病基础与临床研究及抗病毒中草药开发。Tel: (0734) 8279057 E-mail: lesjie62@hotmail.com