

竹叶黄酮对乙醇诱导小鼠急性胃黏膜损伤的保护作用

黄进波¹, 萧钦², 周佳佳¹, 曾龙佳¹, 张冰¹, 毛小玲¹, 黄健玲¹, 韦小娇¹, 陈川¹, 潘尚领^{1*}

1. 广西医科大学 基础医学院, 广西 南宁 530021

2. 广州中医药大学 第二临床医学院, 广东 广州 510120

摘要: **目的** 观察竹叶黄酮对乙醇诱导小鼠急性胃黏膜损伤的保护作用。**方法** 取40只小鼠随机均分为对照组、模型组、维生素E(50 mg/kg)组以及竹叶黄酮25、50 mg/kg组。各组连续ig给药7 d, 1次/d。末次给药1 h后, 各组按10 mg/kg ig给予无水乙醇, 制作胃黏膜损伤模型。建模4 h后, 观察胃黏膜损伤面积, 计算胃黏膜损伤指数和损伤抑制率。测定小鼠胃黏膜组织中一氧化氮(NO)、前列腺素(PEG₂)含量以及血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平。**结果** 与模型组比较, 竹叶黄酮25 mg/kg组小鼠胃黏膜损伤面积减少, 50 mg/kg组小鼠损伤程度最小。与模型组比较, 竹叶黄酮25、50 mg/kg组小鼠胃黏膜损伤指数均明显降低($P < 0.01$); 胃黏膜组织NO、PEG₂含量明显升高($P < 0.01$); 血清SOD、MDA水平明显降低($P < 0.01$), SOD/MDA比值明显升高($P < 0.01$)。**结论** 竹叶黄酮能拮抗乙醇诱导的胃黏膜损伤, 其机制可能与其抗氧化、抑制氧自由基产生并升高胃黏膜NO、PEG₂含量有关。

关键词: 竹叶黄酮; 急性胃黏膜损伤; 损伤指数; 一氧化氮; 前列腺素; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)07-0779-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.07.006

Protection of bamboo leaf flavonoids on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in mice

HUANG Jin-bo¹, XIAO Qin², ZHOU Jia-jia¹, ZENG Long-jia¹, ZHANG Bing¹, MAO Xiao-ling¹, HUANG Jian-ling¹, WEI Xiao-jiao¹, CHEN Chuan¹, PAN Shang-ling¹

1. School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To observe protective effect of bamboo leaf flavonoids on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in mice.

Methods A total of 40 mice were randomly divided into control group, model group, vitamin E group (50 mg/kg) and bamboo leaf flavonoids 25, 50 mg/kg groups. All the animals were ig administered with drugs for 7 d, once daily. Mice in treatment groups were ig administered with ethanol 10 mL/kg to make acute gastric mucosal injury models 1 h after the last medication. After 4 h model were made, gastric mucosal injury areas were observed, and mucosal injury index and injury inhibition rates were calculated. Contents of NO and PEG₂ in gastric mucosa tissue were detected, and in the same times, levels of MDA and the activity of SOD in serum were determined. **Results** Compared with model group, gastric mucosal injury areas in mice of bamboo leaf flavonoids 25 mg/kg group reduced, and those of bamboo leaf flavonoids 50 mg/kg group were minimum. Compared with model group, gastric mucosal injury index of mice in bamboo leaf flavonoids 25, 50 mg/kg group significantly reduced ($P < 0.01$), contents of NO and PEG₂ in gastric mucosa tissue obviously increased ($P < 0.01$), levels of MDA and SOD in serum were significantly decreased ($P < 0.01$), while the value of SOD/MDA significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Bamboo leaf flavonoids can prevent ethanol-induced gastric mucosal injury, which perhaps be related to antioxidation, scavenging oxygen free radicals, and increasing the levels of NO and PEG₂ in gastric mucosa tissues.

Key words: bamboo leaf flavonoids; acute gastric mucosal injury; injury index; NO; PEG₂; SOD; MDA

收稿日期: 2015-04-19

作者简介: 黄进波(1989—), 男, 硕士研究生, 从事抗肿瘤药物研究。Tel: 15296543816 E-mail: hjb0205@163.com

*通信作者 潘尚领(1965—), 男, 教授, 医学博士, 从事人类长寿和衰老分子遗传学机制研究。

Tel: (0771)5358292 E-mail: sl.pan.berkeley@gmail.com

我国竹叶资源丰富, 具有悠久的药用历史, 竹叶黄酮是从竹叶中提取的植物性黄酮, 具有防腐抗菌等多种生物活性^[1]。近年来研究表明, 竹叶黄酮具有清除活性氧自由基的作用, 是一类天然的抗氧化剂和自由基清除剂, 其抗氧化和清除自由基作用正日益受到关注^[2]。急性胃黏膜损伤是以胃黏膜发生不同程度糜烂、浅溃疡和出血为特征的病变。研究显示氧自由基是急性胃黏膜损伤的重要致病因子, 中医药在清除氧自由基, 保护胃黏膜损伤方面具有其独特的效果^[3-4]。已有研究证明竹叶黄酮可以降低小鼠脂质过氧化^[5], 对心、肝、脑等器官具有保护作用^[6-7]。本研究通过无水乙醇诱发小鼠胃黏膜损伤, 测定小鼠胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量以及血清 SOD、MDA 水平, 探讨竹叶黄酮对乙醇诱导小鼠急性胃黏膜损伤的保护作用, 为竹叶黄酮的开发利用提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DSC-W507D 数码照相机 (索尼数字产品有限公司); 9610A082 分光光度计 (上海第三分析仪器厂); 95 °C 恒温水浴箱子; 台式离心机。

1.2 动物

昆明种小鼠 40 只, 雌雄兼有, 体质量 (21.88 ± 2.67) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 动物使用许可证号 SCXK (桂) 2003-0003。

1.3 试剂

竹叶黄酮购自西安施诺特生物有限公司, 以芦丁计算的总黄酮质量分数为 50.08%; SOD、MDA、NO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20120507、20120501、20120506); 维生素 E 软胶囊 (桂林南药股份有限公司, 批号 20130959, 规格 50 mg/粒)。

2 方法

2.1 分组与给药

将 40 只小鼠按体质量以随机数字表法随机分为对照组、模型组、维生素 E (50 mg/kg) 组以及竹叶黄酮 25、50 mg/kg 组。各组连续 ig 给药 7 d, 1 次/d。对照组、模型组给予生理盐水 10 mL/kg, 给药 7 d 后禁食 24 h, 自由饮水。

2.2 建模

末次给药 1 h 后, 其余各组按 10 mg/kg ig 给予无水乙醇, 制作胃黏膜损伤模型^[8]。对照组按 10

mL/kg ig 给予生理盐水。

2.3 胃黏膜损伤程度观察

建模 4 h 后, 采用颈椎脱臼法处死所有小鼠。剖开腹部, 用线结扎幽门和贲门, 把胃取出, 将 5% 甲醛溶液 2 mL 注入胃腔, 并将胃全部浸泡于甲醛溶液中进行固定 30 min。沿胃大弯剪开, 用生理盐水冲洗胃黏膜后展平, 并置于放大镜下观察胃黏膜损伤面积, 用直尺测量胃黏膜损伤面积, 计算胃黏膜损伤指数。

2.4 胃黏膜损伤指数和损伤抑制率的测定

胃黏膜损伤指数按参考文献标准计分^[9]: 正常黏膜为 0 分, 黏膜损伤面积不大于 1.0 mm 的计为 1 分, 1.0~2.0 mm 的计为 2 分, 依次类推。全胃评分数值为该小鼠胃黏膜损伤数的总和, 并计算除对照组外各组的胃黏膜损伤抑制率。

损伤抑制率 = (模型组损伤指数 - 各药物组损伤指数) / 模型组损伤指数

2.5 胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量的测定

对照组剪取正常胃黏膜, 其余组剪取胃黏膜溃疡组织处, 用滤纸吸干水分, 称定质量, 制备胃组织匀浆液, 严格按照试剂盒说明书测定胃组织中 NO 含量, 并按照文献报道方法^[10]测定 PEG₂ 含量。

2.6 血清中 SOD、MDA 水平的测定

各组小鼠末次给药后 4 h, 眼球取血 100 μL, 加生理盐水稀释 20 倍后 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 分别取 0.1 mL 血清按照试剂盒说明书操作测定 SOD、MDA 水平。

2.7 统计学方法

数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较用 q 检验, 若方差不齐使用秩和检验, 并行组间多重比较。

3 结果

3.1 胃黏膜损伤程度观察

对照组小鼠胃黏膜表面未见溃疡、糜烂以及出血点。模型组小鼠胃黏膜损伤包括糜烂、溃疡、出血等, 损伤面积大、程度重, 多呈片状坏死斑块。与模型组比较, 维生素 E 组和竹叶黄酮 25 mg/kg 组小鼠胃黏膜损伤面积减少, 可见部分出血点以及条索状糜烂, 未见溃疡形成。竹叶黄酮 50 mg/kg 组小鼠损伤程度最小, 胃黏膜可见少许点状糜烂, 未见溃疡及出血现象。见图 1。

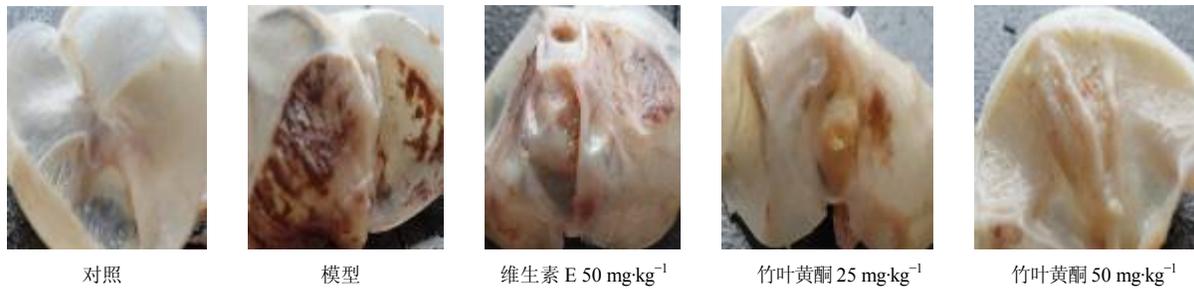


图1 小鼠胃黏膜损伤大体观

Fig. 1 External views of gastric mucosal injury of mice

3.2 胃黏膜损伤指数和损伤抑制率的测定

与对照组比较, 给药组小鼠胃黏膜损伤指数均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 维生素 E 组和竹叶黄酮 25、50 mg/kg 组小鼠胃黏膜损伤指数均明显降低 ($P < 0.01$)。与维生素 E 组比较, 竹叶黄酮 50 mg/kg 组小鼠胃黏膜损伤抑制率明显升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.3 胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量的测定

与对照组比较, 模型组小鼠胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 维生素 E 组和竹叶黄酮 25、50 mg/kg 组小鼠胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量明显升高 ($P < 0.01$)。

与维生素 E 组比较, 竹叶黄酮 50 mg/kg 组小鼠胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量明显升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.4 血清中 SOD、MDA 水平的测定

与对照组比较, 模型组小鼠血清 SOD、MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$), SOD/MDA 比值明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 维生素 E 组和竹叶黄酮 25、50 mg/kg 组小鼠血清 SOD、MDA 水平明显降低 ($P < 0.01$), SOD/MDA 比值明显升高 ($P < 0.01$)。与维生素 E 组比较, 竹叶黄酮 50 mg/kg 组小鼠血清 SOD、MDA 水平明显降低 ($P < 0.01$), SOD/MDA 比值明显升高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表1 竹叶黄酮对小鼠胃黏膜损伤指数和损伤抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of bamboo leaf flavonoids on gastric mucosal injury index and injury inhibition rates of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	胃黏膜损伤指数	损伤抑制率/%
对照	—	0	
模型	—	150.00 ± 57.73**	0
维生素 E	50	100.75 ± 14.14 ^{△△}	32.83
竹叶黄酮	25	91.80 ± 19.17 ^{△△}	38.80
	50	50.00 ± 24.50 ^{△△###}	66.67 ^{###}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与维生素 E 组比较: ^{###} $P < 0.01$

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

表2 竹叶黄酮对胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of bamboo leaf flavonoids on NO and PEG₂ contents in gastric mucosa tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NO/(μmol·g ⁻¹)	PEG ₂ /(μmol·L ⁻¹)
对照	—	2.84 ± 0.68	39.50 ± 9.02
模型	—	2.36 ± 0.36**	32.14 ± 7.04**
维生素 E	50	2.45 ± 0.76 ^{△△}	38.95 ± 8.43 ^{△△}
竹叶黄酮	25	2.56 ± 0.55 ^{△△}	39.27 ± 9.19 ^{△△}
	50	2.93 ± 0.67 ^{△△###}	43.75 ± 8.76 ^{△△###}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与维生素 E 组比较: ^{###} $P < 0.01$

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

表 3 竹叶黄酮对小鼠血清 SOD、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Effects of bamboo leaf flavonoids on SOD activity and MDA levels in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(nU·mL ⁻¹)	MDA/(mmol·mL ⁻¹)	SOD/MDA
对照	—	176.24±20.05	73.50±15.06	2.44±0.16
模型	—	240.36±33.34**	168.00±21.94**	1.42±0.11**
维生素 E	50	214.25±24.89 ^{△△}	135.25±25.45 ^{△△}	1.63±0.14 ^{△△}
竹叶黄酮	25	211.46±23.09 ^{△△}	114.25±42.11 ^{△△}	1.92±0.13 ^{△△}
	50	180.73±20.67 ^{△△##}	73.75±16.66 ^{△△##}	2.43±0.17 ^{△△##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与维生素 E 组比较: ^{##} $P < 0.01$

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

4 讨论

实验选用抗氧化剂维生素 E 作为对照药, 动物实验表明维生素 E 作为一种抗氧化剂, 具有清除氧自由基和抑制脂质过氧化物的功能, 对小鼠胃黏膜损伤具有保护作用^[11]。本研究中维生素 E 所选的剂量 (50 mg/kg) 为其临床用量的最高值^[11], 也是现有文献报道中对胃黏膜起保护作用的最高剂量^[12]。由于目前没有竹叶黄酮在保护胃黏膜免受损伤的明确用量, 本实验在竹叶黄酮的临床用量范围内^[13], 选取与维生素 E 相同的剂量作为高剂量, 高剂量的一半作为低剂量。

近年来众多研究表明, 脂质过氧化反应参与了胃黏膜损伤的致病机制。在乙醇的刺激下, 胃黏膜组织可产生大量氧自由基, 并且氧自由基生成量与乙醇呈剂量相关性^[14]。氧自由基与膜内多价不饱和脂肪酸结合, 形成丙二醛 (MDA)、过氧化脂质 (LPD) 等。氧自由基、LPD 及 MDA 均能对膜结构产生严重损伤^[15]。正常情况下, 自由基的生成与清除处于动态平衡状态。SOD 作为有氧代谢细胞生存所必须的一种抗氧化酶, 能够对代谢过程中产生的氧自由基发挥清除作用。在胃黏膜损伤的急性期, 由于氧自由基大量生成, 机体处于应激状态, SOD 会被紧急动员而活性往往高于正常水平^[12]。这表明大量自由基的产生可能会诱发抗氧化酶的表达以维持机体氧化-抗氧化的动态平衡。作为氧自由基的产物, MDA 能反映机体脂质过氧化的程度, 模型组小鼠处于胃黏膜损伤的急性期, 大量氧自由基生成, MDA 含量显著高于正常组。由于应激的持续, SOD 逐渐消耗, 其活性会发生动态变化, 因此有研究^[16]认为单纯根据 SOD 或 MDA 单项指标的变化不足以反映机体的抗氧化能力, 必须两者综合考虑, 即 SOD/MDA 的比值是反映生物体抗脂质过氧化潜

在能力的一项重要指标。本实验模型组 SOD/MDA 较对照组显著降低, 表明无水乙醇诱发胃黏膜损伤后, 机体紧急动员 SOD 来应对应激, 但仍不足以清除过多的氧自由基, 体内氧自由基生成大于清除能力, 引起强烈的胃黏膜脂质过氧化反应。维生素 E 组与竹叶黄酮组 SOD/MDA 较模型组升高, 表明维生素 E 与竹叶黄酮可能外源性参与了抗氧化、抑制氧自由基的产生过程。

此外, 本研究还发现, 维生素 E 组以及竹叶黄酮 25、50 mg/kg 组小鼠胃黏膜组织 NO、PEG₂ 含量较模型组明显升高。NO 是由一氧化氮合酶 (NOS) 催化产生的一种信使分子和炎症介质, NOS 在胃黏膜损伤中起重要作用, 其催化的 NO 参与胃黏液的分泌与胃酸的调节, 能够舒张胃黏膜血管, 维持胃黏膜完整性, 起到保护胃黏膜的作用。PEG₂ 作为胃黏膜中主要的前列腺素之一, 可改善胃黏膜血流, 充足的胃黏膜血流不但可以为胃黏膜细胞提供丰富的氧气和营养, 还可以清除对上皮屏障具有损伤作用的物质, 对胃黏膜的完整起到重要的保护作用。竹叶黄酮对胃黏膜的保护作用有可能是通过增加小鼠胃组织中 NOS 活性以及 NO 和 PEG₂ 的含量, 减轻胃黏膜的损伤。

随着社会交往的日益频繁, 人群日常饮酒量也日益增多, 酒精性胃损伤的发病率亦在逐年增加。维生素 E 被认为是一种良好的抗氧化药物, 动物实验表明其对胃黏膜的保护作用要强于西咪替丁^[10]。本研究结果显示, 竹叶黄酮能拮抗乙醇所致的胃黏膜损伤, 其机制可能与其抗氧化、抑制氧自由基产生并升高胃黏膜 NO、PEG₂ 含量有关。竹叶黄酮作为一种植物黄酮制剂, 较维生素 E 具有更强的抗氧化作用, 在预防酒精性胃黏膜损伤中显示出了美好的应用前景。

参考文献

- [1] 夏海军. 竹叶提取物生物活性研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13470-13472.
- [2] 许 纲, 张 虹, 董建红, 等. 竹叶提取物清除 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot OH$ 自由基的研究 [J]. 营养学报, 2001, 23(1): 79-81.
- [3] 刘晓艳, 屠伟峰. 中医药对急性胃黏膜损伤保护作用的研究进展 [J]. 华南国防医学杂志, 2011, 25(4): 354-355.
- [4] 许海玉, 赵 平, 张铁军, 等. 胃黏膜损伤相关疾病中药的研究现状及其开发思路 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 302-306.
- [5] 冯 磊, 沈 健. 竹叶提取物降低小鼠脂质过氧化、升高 GSH-Px 和 SOD 活力的作用研究 [J]. 现代康复, 1999, 3(3): 334-336.
- [6] 付晓春, 王敏伟, 李少鹏, 等. 竹叶提取物对犬实验性心肌梗死的保护作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 134-137.
- [7] 高 飞, 周 瑜, 王向军, 等. 竹叶提取物抗肿瘤和神经保护作用研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 710-715.
- [8] 夏 敏, 陶嘉泳. 乙醇对小鼠胃粘膜的损伤机制 [J]. 新消化病学杂志, 1997, 5(4): 211-212.
- [9] Kitagawa H, Fujiwara M, Osumi Y. Effects of water-immersion stress on gastric secretion and mucosal blood flow in rats [J]. *Gastroenterology*, 1979, 77(2): 298-302.
- [10] 于海玲, 郭建鹤, 王 丹. 老鹤草对小鼠无水乙醇型胃溃疡的影响 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (4): 874-875.
- [11] 陈新谦, 金有豫, 汤 光. 新编药理学 [M]. 第 16 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 193, 462, 691.
- [12] 王彩冰, 晋 玲, 黄俊杰, 等. 维生素 E 对胃黏膜损伤模型小鼠的保护作用研究 [J]. 中国药房, 2012, 23(9): 811-813.
- [13] 李艳芳, 滕燕华. 竹叶与人类健康 [M]. 北京: 中国医药出版社, 2004: 52-72.
- [14] 何绍珍. 乙醇性胃黏膜损伤中氧自由基与线粒体 DNA ATPase6, 8 基因表达关系的研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2007.
- [15] 邹 雄. 自由基的实验室检查 [J]. 山东医药, 1994, 34(2): 42-43.
- [16] 曾庆海, 吴元强, 唐 玲, 等. 慢性心理应激对小鼠血清中 TYR, SOD 和 MDA 的影响 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2012, 26(5): 379-382.