

采用鼠尾横切法测定小鼠尾出血时间 (bleeding time, BT)。动物分组及给药方法同上,给药后 30 min,将小鼠置于固定器中,使其尾部垂直,于尾尖处剪断鼠尾,每隔 30 s 用滤纸轻吸尾尖血液,直至吸不出血液,记录断尾至出血停止时间,即为 BT,与 NS 组比较计算各给药组 BT 延长率。结果见表 3。

表 3 VSRN 对小鼠 CT 和 BT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of VSRN on CT and BT of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	CT		BT	
		时间/s	延长率/%	时间/s	延长率/%
NS	-	118.50 $\pm$ 24.00	-	13.70 $\pm$ 3.10	-
VSRN	5.0	136.50 $\pm$ 16.80 *	13.18	17.30 $\pm$ 1.68 *	20.81
	10.0	193.00 $\pm$ 16.40 *	38.60	23.00 $\pm$ 5.90 *	40.43
	20.0	231.00 $\pm$ 10.30 **	48.70	27.00 $\pm$ 3.20 **	49.25

与 NS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

3 讨论

血液流变学指标中血液比黏度的增高或降低对心血管系统疾病的发生有预测、预报的作用。本实验结果表明 VSRN 能显著降低家兔的低切全血比黏度和高切全血比黏度,并呈剂量依赖性,说明 VSRN 能够降低红细胞聚集性,并增强红细胞变形能力;结果还表明 VSRN 降低血浆比黏度,说明不但对血液中影响黏度的细胞成分有改善作用,而且对血液中非细胞成分(如纤维蛋白原、血脂等)也有改善作用^[8]。这些表明 VSRN 具有降低血液黏度的

作用。本研究发现 iv VSRN 导致 RT 和 TT 的延长,说明 VSRN 作用于血凝级联反应中内源性通路和共同通路从而产生抗凝作用。以上研究进一步证明 VSRN 是乌苏里藜芦总碱抗血栓活性成分之一。VSRN 在降黏抗凝的同时,还显示一定的 CT、BT 延长作用,提示在应用 VSRN 降黏抗栓的同时,应注意其可能产生的出血不良反应。本研究结果为 VSRN 的抗栓作用提供了进一步实验支持。

参考文献:

- [1] Li H, Gao G Y, Li S Y. Effects of *Veratrum nigrum* alkaloids on central catecholaminergic neurons of renal hypertensive rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(1): 23-28.
- [2] 徐敦海,徐雅红. 藜芦属植物化学成分和药理作用 [J]. 国外医药:植物分册, 2002, 17(5): 1835-1839.
- [3] Han G Z, Li X Y, Lu L, et al. Pharmacokinetic profiles of *Veratrum nigrum* L. var. *ussuense* Nakai alkaloids in rats [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokin*, 2001, 1(3): 1692-1741.
- [4] 赵伟杰,陈 钧,郭永田. 藜芦生物碱的化学研究 [J]. 中药通报, 1987, 12(1): 34-35.
- [5] Zhao W J, Tezuka Y, Kikuchi I T, et al. Studies on the constituents of *Veratrum nigrum* L. var. *ussuense*. Structure and ^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectra of a new alkaloid, verussurinine, and related alkaloids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1911, 39(3): 549-554.
- [6] Tezuka Y, Kikuchi I T, Zhao W J, et al. (+)-Verussurinine, a new steroidal alkaloid from the roots and rhizoma *Veratrum nigrum* var. *ussuense* and structure revision of (+)-verussurinine [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(11): 1397-1399.
- [7] 邓伟峰,赵伟杰,吕 莉,等. 乌苏里藜芦的抗血栓作用 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1836-1838.
- [8] 杨晓静,张泓巍,张大伟,等. 胶陀螺对血瘀动物血液流变学的影响 [J]. 中草药, 1996, 27(6): 358.

高良姜总黄酮对实验性胃黏膜损伤的保护作用及其机制

江 涛,唐春萍,冯毅凡,杨超燕,楚 博,林楚雄*

(广东药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 研究高良姜总黄酮对无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用及其机制。方法 采用无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤模型,通过测定胃黏膜溃疡指数观察高良姜总黄酮对胃黏膜损伤的保护作用;测定血清一氧化氮(NO)的量、胃黏膜组织丙二醛(MDA)的量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性以及胃壁结合黏液量来探讨作用机制。结果 高良姜总黄酮可剂量依赖性地降低无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤指数,显著升高血清 NO 和胃壁结合黏液量,明显阻遏乙醇引起的胃黏膜 MDA 水平升高和 SOD 活性降低。结论 高良姜总黄酮对实验性胃黏膜损伤具有明显的保护作用,其机制可能与抗氧化、增强胃黏膜保护因子有关。

关键词:高良姜总黄酮;胃黏膜损伤;SOD

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1117-03

* 收稿日期:2008-12-06

基金项目:广东省教育部产学研结合项目(2006D90504006)

作者简介:江 涛(1966—),男,副教授,主要研究方向为新药研究与开发。 Tel: (020) 39352152 E-mail: tjiang66 @21cn.com

高良姜为姜科植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的根茎,味辛性温,具有温胃散寒、祛风止痛之功效,用于脘腹冷痛、胃寒呕吐、暖气吞酸等症,临床上常用于治疗消化性溃疡及急慢性胃肠炎^[1]。前期研究表明高良姜总黄酮 (flavonoids of *A. officinarum*, FAO) 对大鼠急、慢性胃溃疡均有明显的抑制作用,并对胃酸分泌也有一定的抑制作用。本实验采用无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤模型,研究高良姜总黄酮对胃黏膜防御因子 NO、胃壁结合黏液量以及 MDA 水平、SOD 活性的影响,探讨高良姜总黄酮对无水乙醇致胃黏膜损伤保护作用的可能机制,为其临床治疗消化性胃溃疡提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂:高良姜总黄酮(质量分数 > 50%),由广东药学院测试中心提供(批号 080412),临床用时以 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成所需浓度;奥美拉唑胶囊,上海大众药业有限公司生产(批号 080623);阿利新蓝(Alcian blue 8GX);NO 试剂盒(批号 20080721)、MDA 试剂盒(批号 20080621)、考马斯亮兰试剂盒(批号 20080912)、SOD 试剂盒(批号 20080611)均由南京建成生物工程研究所生产。

1.2 动物:SD 大鼠(SPF 级,合格证号 2008A001),雌雄兼用,广东省医学实验动物中心提供。

1.3 仪器:TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),UV-1800 紫外-可见光光度计(北京瑞利分析有限公司),XHF-D 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 实验分组、给药及模型制备^[2]:取 SD 大鼠 120 只,雌雄各半,体质量为 180~220 g,随机分成 6 组:对照组,模型组,奥美拉唑组(8 mg/kg)、高良姜总黄酮高、中、低剂量(0.5、0.25、0.125 g/kg)组。给药组每天 ig 给药 1 次,空白对照和模型组 ig 等体积 0.5% CMC-Na,连续 3 d。实验前,大鼠禁食不禁水 24 h,末次给药后 1 h,除空白对照组外,其余各组大鼠 ig 1.0 mL 无水乙醇,1 h 后进行各项试验。

2.2 对无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤的影响^[2]:每组各取 10 只大鼠,脱臼处死,结扎胃贲门和幽门并经胃壁向胃腔内注入 1% 的甲醛溶液 8 mL 后,将胃取出,放入 1% 甲醛溶液中固定 10 min,沿胃大弯剪开胃壁,计算各组的溃疡指数(条索状损伤的长度大于 1 mm 者测量其长度,1 mm 计 1 分,若宽度超过 1 mm 者将其计分加倍,计分总数为组的溃疡

指数),同时计算溃疡抑制率[抑制率=(对照组溃疡指数-给药组溃疡指数)/对照组溃疡指数×100%]。

2.3 对无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤模型胃壁结合黏液量的影响:参照 Coren 等^[3]的阿利新蓝染色法测定胃壁结合黏液量。每组各取 10 只大鼠,将胃取出,蒸馏水清洗 2 次,滤纸吸干表面水分,沿胃大弯剪开鼠胃,浸泡于 20 mL 阿利新蓝溶液(0.2 g/mL, pH 5.8)中于 25℃ 温化孵育 2 h 后取出胃,反应液离心,取上清液于分光光度计 615 nm 波长处测吸光度值。计算胃壁结合黏液量。

2.4 对无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤模型血清 NO 量、胃黏膜 MDA 量和 SOD 活性的影响:每组各取 10 只大鼠眼眶取血,分离血清,按试剂盒方法测定 NO 的量,然后脱颈椎处死大鼠,将胃取出,沿胃小弯剪开外翻,用 4℃ 生理盐水冲洗,用玻片将新鲜腺胃部胃黏膜组织轻轻刮下,低温冷冻后称质量,加入 9 倍量的冰生理盐水,冰浴下用匀浆机制成 10% 的组织匀浆,按试剂盒说明测定 SOD 活性(羟氨法)和 MDA 水平(硫代巴比妥酸法)。

2.5 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤的影响:表 1 结果可见,高良姜总黄酮高、中、低剂量与模型组比较能明显减轻无水乙醇所致大鼠急性胃黏膜损伤($P < 0.01, 0.05$),表明高良姜总黄酮对无水乙醇致大鼠急性胃黏膜损伤模型有明显的保护作用。

表 1 高良姜总黄酮对无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of FAO on gastric mucosa of rats injured by absolute ethanol ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	溃疡指数	抑制率/%
对照	-	0 **	-
模型	-	95.15 ± 29.54	-
奥美拉唑	0.008	33.43 ± 26.71 **	64.87
高良姜总黄酮	0.125	66.20 ± 16.92 *	30.43
	0.25	48.30 ± 17.58 **	49.24
	0.5	40.85 ± 14.57 **	57.07

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

3.2 对无水乙醇致胃黏膜损伤大鼠胃壁结合黏液量的影响:表 2 结果显示,高良姜总黄酮高、中、低剂量能明显增加胃壁结合黏液量,与模型组比较有显著差异($P < 0.01, 0.05$),提示高良姜总黄酮可促进大鼠胃壁结合黏液分泌,作用呈现良好的量效关系。

3.3 对无水乙醇致胃黏膜损伤大鼠血清 NO 量、胃黏膜 MDA 量和 SOD 活性的影响:由表 3 可见,高良姜总黄酮高、中、低剂量能明显增加血清中 NO 的量和胃黏膜 SOD 活性,以及降低胃黏膜 MDA 水平,与模型组比较有显著差异 ($P < 0.01, 0.05$)。提示高良姜总黄酮在体内有清除氧自由基的作用。

表 2 高良姜总黄酮对无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤胃壁结合黏液量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of FAO on adherent mucus quantity of stomach wall of rats injured by absolute ethanol ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	胃壁结合黏液量/mg
对照	-	3.41 ± 0.10 **
模型	-	1.77 ± 0.45
奥美拉唑	0.008	3.24 ± 0.14 **
高良姜总黄酮	0.125	2.34 ± 0.50 *
	0.25	2.30 ± 0.41 *
	0.5	2.49 ± 0.21 **

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

表 3 高良姜总黄酮对无水乙醇致胃黏膜损伤大鼠血清 NO 量和胃黏膜 MDA 水平、SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of FAO on NO concentration in serum, MDA level, and SOD activity in gastric mucosal tissues of rats with gastric mucosal lesion induced by absolute ethanol ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/(nmol · mg ⁻¹)	SOD/(U · mg ⁻¹)
对照	-	84.18 ± 13.62 **	2.06 ± 0.60 **	3.60 ± 0.41 **
模型	-	44.61 ± 7.17	6.72 ± 2.86	2.35 ± 0.93
奥美拉唑	0.008	82.83 ± 17.73 **	2.40 ± 0.69 **	3.21 ± 0.57 *
高良姜总黄酮	0.125	56.23 ± 9.35 *	2.61 ± 0.66 **	3.27 ± 0.56 *
	0.25	61.28 ± 7.51 **	3.48 ± 1.12 **	3.34 ± 0.43 **
	0.5	78.96 ± 7.91 **	3.88 ± 1.66 **	3.57 ± 0.56 **

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

4 讨论

胃溃疡发生是由于胃黏膜损伤因子和保护因子失衡所致,即与胃酸、胃蛋白酶、幽门螺旋杆菌、药物损害及氧自由基等损伤作用增强,胃黏膜屏障、细胞膜完整性、细胞再生能力、血液供应等保护作用减弱有关。据研究,有诸多因素参与胃黏膜的保护作用,胃黏膜是胃黏膜屏障的重要因素之一,在胃黏膜上皮覆盖的黏液凝胶起着非流动层的作用,减慢胃腔内 H⁺ 向胃黏膜内的扩散;NO 作为一种舒血管因

子,能明显扩张胃黏膜血管,改善胃血流量,维持胃黏膜上皮完整性,促进黏膜损伤后修复^[4];急性胃黏膜损伤能产生大量氧自由基、脂质过氧化代谢产物,体内抗氧化物质超氧化物歧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)量是反映体内自由基损伤的指标,药物通过提高 SOD 活性、降低 MDA 量来清除胃黏膜急性损伤过程中产生的氧自由基^[5]。

无水乙醇可以直接作用于胃黏膜,损伤黏膜上皮,破坏细胞间连接装置造成黏膜损伤;同时可以间接影响黏膜血流导致黏膜供血障碍,从而损伤胃黏膜细胞形成炎症。炎症过程中可产生大量的氧自由基,丙二醛就是 O[·]在有氧条件下,攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发其发生脂质过氧化作用形成的物质^[6]。大量高浓度的乙醇可影响黏蛋白寡聚糖的合成及其在胃黏膜表面的停留,诱发氧自由基产生,导致黏膜脂质过氧化,短期内可导致动物胃黏膜充血水肿、腺体增生、糜烂^[7]。

本研究结果表明,高良姜总黄酮能够显著提高无水乙醇致胃黏膜损伤大鼠胃壁结合黏液量,提高胃黏膜 SOD 活性和降低 MDA 的量,提高血清中 NO 量,说明高良姜总黄酮对无水乙醇致胃黏膜损伤具有良好的保护作用,其对胃黏膜的保护作用与其抗氧化、清除氧自由基的能力并能促进胃黏液量的分泌,提高胃黏膜的保护因子,增强胃黏膜的保护机制有关。

参考文献:

- [1] 王本祥. 现代中药药理与临床 [M]. 天津:天津科技翻译出版公司, 2004.
- [2] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002.
- [3] Coren S J, Morrissey S M, Woods R J. A method of quantitative estimation of gastric barrier mucus [J]. *Physiology*, 1974, 242: 116.
- [4] Qui B S, Mei Q B, Liu L, et al. Effects of nitric oxide on gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 594.
- [5] Brune K, Szelenyi I. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 1988, 33(7): 865-871.
- [6] Knoll M R, Kolbel C B, Teyssen S, et al. Action of pure ethanol and some alcoholic beverages on the gastric mucosa in healthy humans: a descriptive endoscopic study [J]. *Endoscopy*, 1998, 30(3): 293-301.
- [7] Szabo S, Trier J S, Brown A, et al. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat [J]. *Gastroenterology*, 1985, 88(3): 228-236.