

醋炙减弱甘遂醋酸乙酯部位对小鼠胃肠黏膜通透性影响的研究

王文晓, 高 兰, 张 丽, 丁安伟*

南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 探讨醋炙减弱甘遂醋酸乙酯部位对小鼠胃肠道黏膜通透性影响的机制。**方法** 将小鼠分为对照组、甘遂组、醋甘遂组, ig 给药 7 d 后, 取小鼠胃、肠组织进行透射电镜观察; 并通过免疫组化的方法, 测定胃肠组织中 E-钙黏蛋白和血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 蛋白的表达。**结果** 透射电镜观察结果显示, 甘遂组胃固有腺体上皮排列紊乱, 细胞质电子密度不均匀, 细胞核形态不规则, 腺上皮表面有大量溶酶体出现; 醋甘遂组胃固有形态上皮细胞形态规则, 部分线粒体畸形; 甘遂组肠黏膜表面微绒毛高度变矮, 细胞间连接丰富, 但近表面的紧密连接较短; 醋甘遂组肠上皮细胞排列规则, 细胞形态一致, 表面微绒毛数量减少、高度变矮, 但较规则, 线粒体结构良好。免疫组化检查结果显示, 与对照组相比, 甘遂组 E-钙黏蛋白表达降低, VCAM-1 蛋白表达增强 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与甘遂组相比, 醋甘遂组 E-钙黏蛋白表达增强 ($P < 0.05$ 、 0.01), VCAM-1 表达降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 醋炙能明显降低甘遂对小鼠胃肠黏膜上皮细胞的刺激, 减弱对胃肠黏膜通透性的影响, 从而降低甘遂的刺激性。

关键词: 甘遂; 醋甘遂; 胃肠黏膜通透性; 刺激性; E-钙黏蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)22-3289-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.014

Attenuation by stir baking with vinegar on effect of ethyl acetate fraction from *Kansui Radix* on mice gastrointestinal permeability

WANG Wen-xiao, GAO Lan, ZHANG Li, DING An-wei

Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To study the mechanism of attenuation by stir baking with vinegar on effect of ethyl acetate fraction of *Kansui Radix* on mice gastrointestinal permeability. **Methods** Mice were randomly divided into blank control, *Kansui Radix*, and *Kansui Radix* stir-baked with vinegar groups. The gastric and intestinal tissues were removed from mice after ig administration for 7 d and were observed by the transmission electron microscope (TEM). The expression of E-cadherin and VCAM-1 was examined by immunohistochemical techniques. **Results** Using TEM, the arrangement and karyon morphology of gastric glandular epithelium cells were irregular with the uneven electronic of cytoplasm and lots of lysosomes in *Kansui Radix* group; The morphology of the gastric epithelial cells was irregular with some abnormal mitochondrions in the cytoplasm in *Kansui Radix* stir-baked with vinegar group; The intestinal mucosa cells were covered with short microvilli with well-connected intercellular junctions, but the tight junctions on the near-surface were short in *Kansui Radix* group; The arrangement and morphology of intestinal epithelial cells were fairly uniform with few and short microvilli and intact mitochondrion in *Kansui Radix* stir-baked with vinegar group. Using immunohistochemical techniques, compared with the control group, *Kansui Radix* could decrease the expression of E-cadherin and increase the expression of VCAM-1 ($P < 0.05$, 0.01). While compared with *Kansui Radix* group, *Kansui Radix* stir-baked with vinegar could obviously increase the expression of E-cadherin ($P < 0.05$, 0.01) and decrease the expression of VCAM-1 ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Stir-baking with vinegar can attenuate the *Kansui Radix*-induced gastrointestinal inflammation. The mechanism may be that it can improve the morphology of mice gastrointestinal mucosal cells, reduce the membrane permeability, and decrease the stimulating effect of *Kansui Radix*.

Key words: *Kansui Radix*; *Kansui Radix* stir-baked with vinegar; gastrointestinal permeability; stimulatory; E-cadherin

收稿日期: 2014-04-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973940, 81373972); 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (2011CB505300, 2011CB505303); 江苏省“六大人才高峰”项目 (2010 年度); 江苏省政府留学奖学金项目 (JS-2009-061); 江苏高校优势学科建设工程项目 (ysxk-2010)

作者简介: 王文晓, 硕士研究生。Tel: 18252066631 E-mail: zwangwenxiao@163.com

***通信作者** 丁安伟, 教授, 从事中药炮制与质量控制研究。Tel: 13951916435 E-mail: awding105@163.com

甘遂始载于《神农本草经》，为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根^[1]。其性寒，味苦，有毒，素有峻下逐水圣药的美称。研究表明，甘遂有强烈的皮肤刺激性和严重的肝脏、胃肠道毒性以及促炎、诱发肿瘤等毒性^[2]。其毒性成分以二萜、三萜类为主，主要集中在醋酸乙酯和石油醚部位^[3-4]。中医采用醋制降低其毒性，且临床上内服多为醋制^[3]。本实验室前期研究亦表明，甘遂醋炙后的醋酸乙酯部位可明显减轻其对小鼠肝脏、胃肠道的氧化损伤^[5-6]。但迄今为止，甘遂醋炙减毒作用机制尚缺乏深入探讨。因此，本实验拟采用整体动物模型，从细胞、分子水平考察甘遂醋炙前后醋酸乙酯部位对小鼠胃肠黏膜通透性的影响，以期探讨甘遂醋炙减毒机制提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 试剂

In Situ Cell Death Detection Kit, AP(购自 Roche 公司，批号 16845720009)；E-钙黏蛋白抗体(批号 2598-4)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1，批号 2491-0)，购自美国 Santa Cruz 公司；即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂盒(批号 44558S)、DAB 显色试剂(批号 87552G) 购自福州迈新生物公司。

1.2 仪器

EL340 全自动酶标仪(美国 Bio-Tek Instruments 公司)；Powerwave X340 全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)；TGL—16M 高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)；WH—90A 微型漩涡混悬器(上海振荣科学仪器有限公司)；JEM—1200EX 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

1.3 药物

甘遂采自陕西宝鸡县赤沙乡，经南京中医药大学王春根教授鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的块根。

1.4 动物

ICR 小鼠，雌雄各半，体质量(20±2) g，由扬州大学比较医学中心提供，动物合格证号为 SCXK(苏) 20070001。

2 方法

2.1 甘遂和醋甘遂醋酸乙酯部位的制备

取净甘遂 2.5 kg 打粉(得率为 99.9%)，备用；甘遂醋炙品(醋甘遂)：取净甘遂 2.5 kg 置不锈钢容器中，用米醋 750 g 拌匀，闷透，待醋被充分吸

尽后，置已加热到 260 ℃ 的炒锅中，不断翻炒至颜色加深略有焦斑时，取出，放凉，打粉(得率为 99.8%)，备用。

将甘遂和醋甘遂粗粉(过 24 目筛)，分别加 95%乙醇 50 ℃温浸 5 次至温浸液近无色，分别合并温浸液，50 ℃减压回收溶剂至近干，浸膏分别加 0.104 kg 和 0.130 kg 硅藻土拌样，加适量醋酸乙酯，采用磁力搅拌器搅拌提取 5 次，至醋酸乙酯萃取液近无色，分别合并萃取液，50 ℃减压回收溶剂至干(甘遂和醋甘遂的醋酸乙酯部位浸膏得率分别为 19.7%和 18.9%，浸膏中大戟二烯醇的质量分数分别为 4.73、3.94 mg/kg)。临用前，用 0.5%的 CMC-Na 溶液配成相当于生药量 256 g/kg 的供试品药液。

2.2 动物分组及给药方法

将 30 只 ICR 小鼠置于室温、通风的清洁级动物室中，自由摄食饮水，适应 3 d 后，按体质量、性别随机分为 3 组，每组 10 只，即对照组、甘遂醋酸乙酯部位组(简称甘遂组)、醋甘遂醋酸乙酯部位组(简称醋甘遂组)。甘遂组和醋甘遂组均 ig 给予上述供试品药液(相当于生药量 256 g/kg)，对照组给予等体积 0.5% CMC-Na 溶液，均为 20 mL/kg，每日 1 次，连续 ig 给药 7 d，于第 7 天给药 1 h 后，脱颈椎处死小鼠，取胃、肠组织，待测。

2.3 指标检测

2.3.1 胃、肠组织结构透射电镜观察 取各组小鼠部分胃、肠组织，切成 1 cm×1 cm 的组织片，放入 2.5%戊二醛后 1%锇酸再固定 1 h，丙酮脱水，Epon-812 树脂包埋，45~65 ℃聚合 48 h，半薄切片定位，70 nm 超薄切片，醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色，JEM—1200EX 型透射电镜观察。

2.3.2 胃、肠组织 E-钙黏蛋白和 VCAM-1 检测 取各组小鼠的胃、肠组织，用 4%中性多聚甲醛固定，常规脱水、石蜡包埋、切片，采用快速免疫组化方法，按即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂盒说明书进行操作。以 PBS 代替一抗作为空白对照。采用 Image-Pro-Plus 4.0 图像分析软件(Media Cybernetics)分析 E-钙黏蛋白及 VCAM-1 切片，测定胃、肠细胞质和(或)细胞核内棕黄色颗粒的累积吸光度。

2.4 数据分析

实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 甘遂醋炙前后对胃组织结构的影响

电镜结果显示, 对照组胃上皮细胞呈立方状或低柱状, 胞质内大量线粒体, 细胞核形态规则(图 1-A); 胞质内线粒体丰富, 大小不一, 结构尚好(图 1-B)。甘遂组胃固有腺体上皮细胞排列紊乱, 细胞质电子密

度不均匀, 细胞核形态不规则(图 1-C); 线粒体形态、大小比较一致, 部分细胞内溶酶体电子密度不一致, 有一个高密度的核心(图 1-D); 部分腺上皮表面有大量溶酶体(分泌颗粒)分布, 溶酶体电子密度高、均匀, 大小比较一致(直径 200~400 nm)(图 1-E)。醋甘遂组胃组织大多数上皮细胞呈立方状、低柱状, 形态规则(图 1-F); 胞质内线粒体、内质网丰富, 部分细胞线粒体畸形, 嵴断裂(图 1-G)。

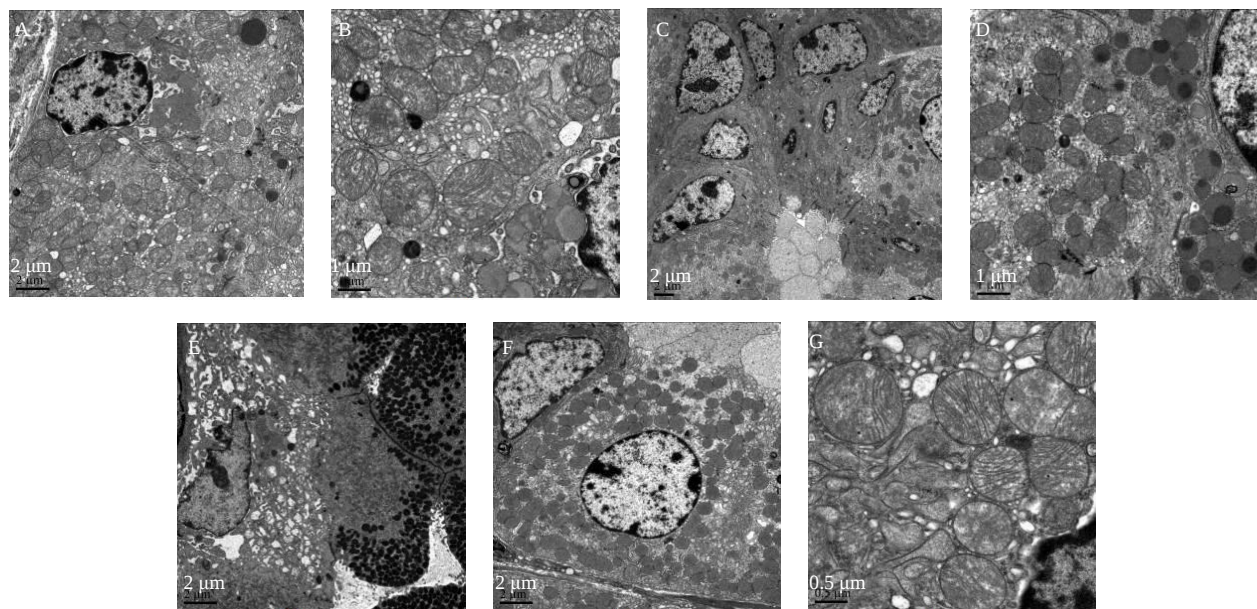


图 1 对照组 (A、B)、甘遂组 (C、D、E) 和醋甘遂组 (F、G) 小鼠胃组织电镜图

Fig. 1 SEM photographs of stomach tissue of mice in control group (A, B), *Kansui Radix* group (C, D, E), and *Kansui Radix* stir-baked with vinegar group (F, G)

3.2 甘遂醋炙前后对肠组织结构的影响

电镜结果显示, 对照组肠细胞表面微绒毛丰富、长而规则, 基底张力细丝丰富(图 2-A); 紧密连接及桥粒结构良好, 线粒体丰富, 形态规则, 结构良好(图 2-B)。甘遂组肠上皮细胞表面微绒毛数量减少、高度变矮, 结构尚好, 细胞间连接丰富, 但近表面的紧密连接较短(图 2-C); 细胞间桥粒结构良好, 线粒体形态不规则, 内有高电子密度颗粒(图 2-D); 细胞器(线粒体、内质网糖原颗粒)较丰富, 线粒体形态不规则, 部分线粒体内见高电子密度的颗粒(图 2-E)。醋甘遂组肠上皮细胞排列规则, 细胞形态一致, 表面微绒毛数量减少、高度变矮, 但较规则(图 2-F); 细胞间连接结构良好, 表面的紧密连接结构良好(图 2-G); 线粒体结构良好(图 2-H)。

3.3 甘遂醋炙前后对胃、肠组织 E-钙黏蛋白和 VCAM-1 的影响

与对照组比较, 甘遂组可以明显提高胃、肠组织中 E-钙黏蛋白灰度值, 即降低胃、肠组织中 E-钙黏蛋白表达 ($P < 0.05$); 与甘遂组比较, 醋甘遂组可明显降低 E-钙黏蛋白灰度值, 即提高胃、肠组织中 E-钙黏蛋白表达 ($P < 0.05$), 结果见图 3 及表 1。

与对照组比较, 甘遂组可以明显降低胃、肠组织 VCAM-1 灰度值, 即提高胃肠组织 VCAM-1 表达 ($P < 0.05$); 与甘遂组比较, 醋甘遂组可明显提高 VCAM-1 灰度值, 即降低胃组织 VCAM-1 表达 ($P < 0.05$), 结果见图 4 及表 1。

4 讨论

胃肠黏膜上皮细胞、上皮细胞之间的紧密连接和黏附连接在维持黏膜通透性中有着十分重要的

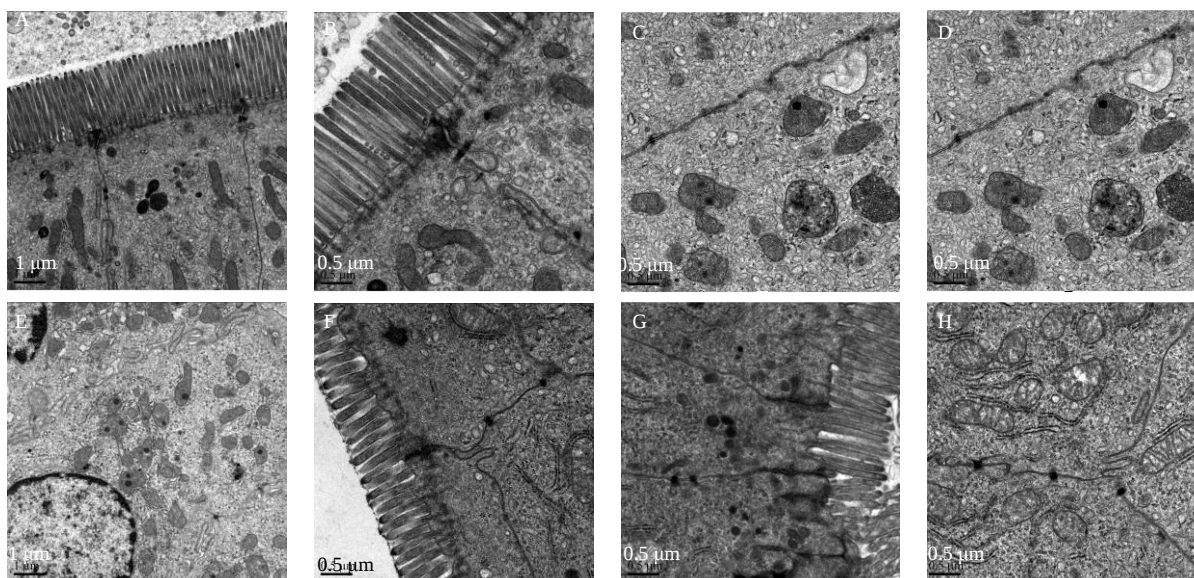


图2 对照组 (A、B)、甘遂组 (C、D、E) 和醋甘遂组 (F、G、H) 小鼠肠组织电镜图

Fig. 2 SEM photographs of intestinal tissue of mice in control group (A, B), *Kansui Radix* group (C, D, E), and *Kansui Radix* stir-baked with vinegar group (F, G, H)

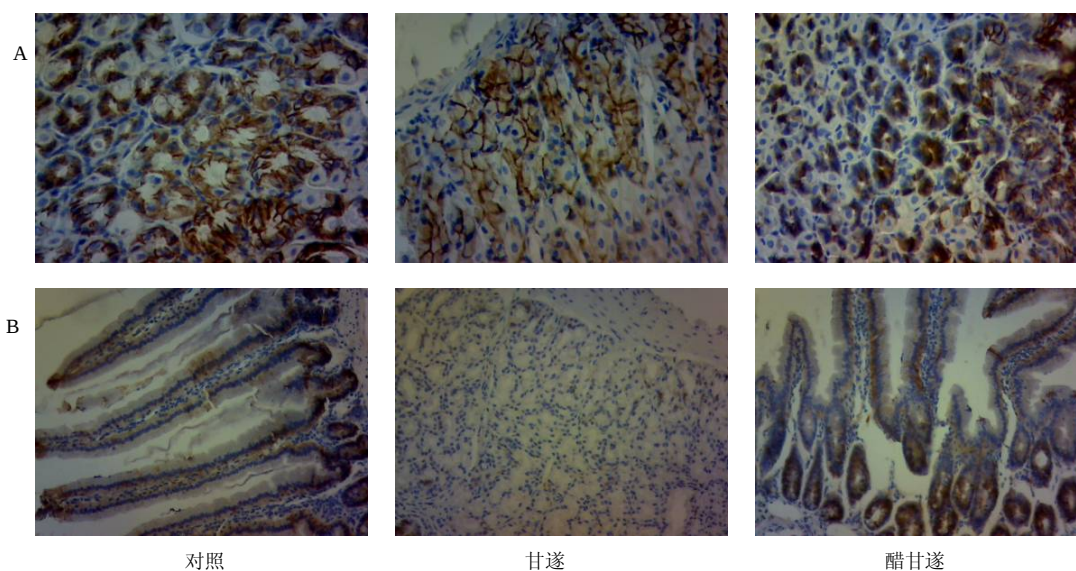


图3 甘遂醋炙前后对小鼠胃 (A) 和肠组织 (B) E-钙黏蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of *Kansui Radix* before and after vinegar-processing on expression of E-cadherin in stomach tissues (A) and intestinal tissue (B) of mice

作用^[7],可以调节水电解质和一些营养物质的转运,并防止胃肠道受损。一旦胃肠道受损,黏膜通透性会增加,毒素等容易侵入,可引起炎症反应。通过电镜观察胃肠黏膜上皮细胞的超微结构可准确判断胃肠黏膜受损及炎症情况。钙黏蛋白超家族是介导同型细胞间黏附的一组跨膜糖蛋白,其中E-钙黏蛋白介导上皮细胞间黏附。黏附分子VCAM-1是黏

附分子中的免疫球蛋白超家族中的主要亚家族,系跨膜表达于血管内皮细胞上的单链糖蛋白。现代毒理学研究发现,缺血缺氧、缺血再灌注、氧化损伤、炎症介质、内毒素、营养障碍、微生态平衡失调、胃肠道黏膜免疫功能受损等易引起胃肠黏膜损伤,且氧化损伤是最重要的致病因素之一^[8-9]。研究表明,机体自由基产生过多可诱导脂质过氧化反应,

表 1 甘遂和醋甘遂对小鼠胃、肠组织 E-钙黏蛋白和 VCAM-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of *Kansui Radix* and *Kansui Radix* stir-baked with vinegar on expression of E-cadherin and VCAM-1 protein in stomach and intestinal tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	E-钙黏蛋白灰度值		VCAM-1 灰度值	
	胃组织	肠组织	胃组织	肠组织
对照	5 423.80 ± 250.01	4 987.25 ± 448.17	8 779.25 ± 1 110.40	7 667.80 ± 983.72
甘遂	6 699.67 ± 1 087.24*	7 190.00 ± 1 640.35*	6 917.25 ± 739.42*	6 516.00 ± 449.35*
醋甘遂	5 220.60 ± 666.50 [#]	5 234.00 ± 293.49 [#]	7 218.75 ± 217.58 [#]	6 519.60 ± 464.98

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与甘遂组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs *Kansui Radix* group

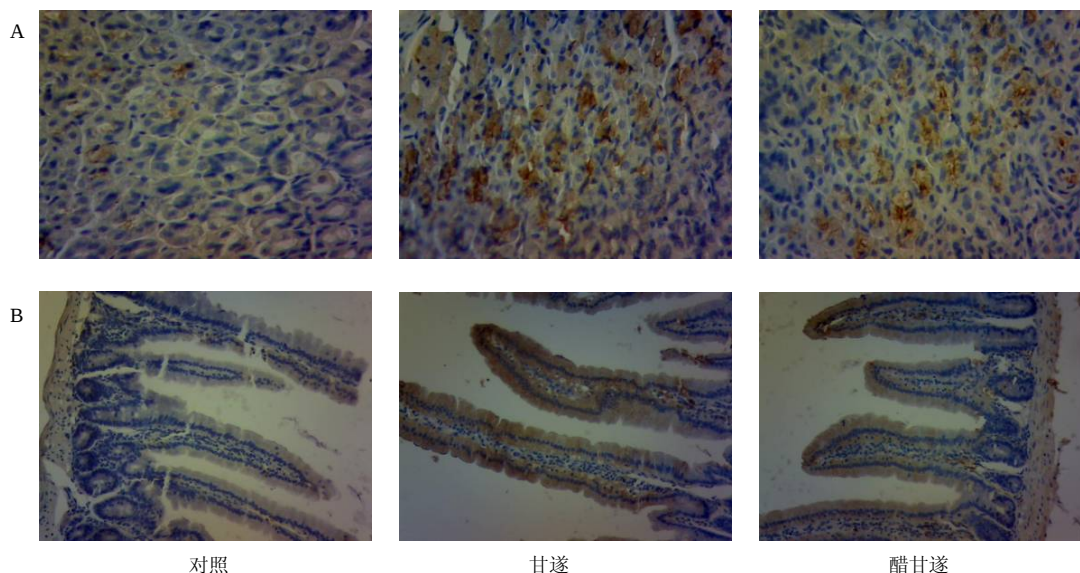


图 4 甘遂醋炙前后对小鼠胃 (A) 和肠组织 (B) VCAM-1 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of *Kansui Radix* before and after vinegar-processing on expression of VCAM-1 in stomach tissues (A) and intestinal tissue (B) of mice

损伤细胞膜,破坏黏膜上皮细胞间的紧密连接和黏附连接,造成 E-钙黏蛋白的表达降低,VCAM-1 的表达增高,从而导致黏膜通透性增加,毒素等侵入并引起炎症反应^[10-12]。

甘遂生品醇提物 LD₅₀ 约为 22 mg/g,相当于生药量 260 mg/g^[13],为更好地体现甘遂的毒性,以利醋制减毒机制的研究,故本实验给药剂量设为 256 g/kg。本实验结果表明,醋炙可以明显降低甘遂对小鼠胃肠黏膜的损伤,其对小鼠胃肠道黏膜通透性的影响可能与以下因素有关:与甘遂相比,醋甘遂减弱了胃肠黏膜中 E-钙黏蛋白和 VCAM-1 的异常表达,减少了胃肠上皮细胞黏附强度的异常降低,从而降低了对胃肠道细胞膜通透性的影响,进而减少了毒素、病原微生物等对胃肠道细胞的破坏。

甘遂因对胃肠道的毒性,严重影响了临床应用。本实验从细胞膜蛋白的角度研究了其醋炙减毒的机制,但由于实验的局限性,尚有待从 DNA、细胞质蛋白等角度进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 郑维发. 甘遂醇提物中 4 种二萜类化合物的体内抗病毒活性研究 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 65-68.
- [3] 耿 婷, 黄海燕, 丁安伟, 等. 甘遂炮制前后各部位刺激性和泻下作用研究 [J]. 中南药学, 2008, 6(4): 385-388.
- [4] 曹雨诞, 张 丽, 李 媛, 等. 甘遂的毒性成分、炮制方法及炮制减毒机制的研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1817-1818.

- [5] 高 兰, 颜晓静, 张 丽, 等. 醋炙降低甘遂对小鼠胃肠道氧化损伤作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 258-260.
- [6] 颜晓静, 张 丽, 李 璘, 等. 醋制降低甘遂对人正常肝细胞毒性研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1667-1671.
- [7] Ivanov A I, Nusrat A, Parkos C A. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers [J]. *Bioessays*, 2005, 27(4): 356-365.
- [8] 孙雪链, 黄可儿, 王淑英, 等. 黄芪皂苷类不同有效组分对大鼠急性胃黏膜损伤的保护作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1181-1185.
- [9] 高金生, 杨书良. 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(5): 1540-1544.
- [10] Hurd T R, Gennaro M D, Lehmann R. Redox regulation of cell migration and adhesion [J]. *J Trends Cell Biol*, 2012, 22(2): 107-113.
- [11] Thews O, Lambert C, Kelleher D K, *et al.* Impact of reactive oxygen species on the expression of adhesion molecules *in vivo* [J]. *J Adv Exper Med Biol*, 2009, 645: 95-100.
- [12] Grande M T, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa J M, *et al.* Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy [J]. *J Inflamm*, 2010, doi: 10.1186/1476-9255-7-19.
- [13] 刁义平. 生甘遂和醋甘遂提取物急性毒性和刺激性实验研究 [J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9(4): 243-246.