

辣蓼提取物对大鼠急性胃黏膜损伤的保护作用研究[△]

任守忠^{1*}, 苏文琴¹, 朱宏锐², 王 宁¹, 牛海艳³, 赵雅媚¹, 马志健^{4#} (1.海南医学院药学院, 海口 571199; 2.海南医学院国际护理学院, 海口 571199; 3.海南医学院病理教研室, 海口 571199; 4.海南医学院解剖教研室, 海口 571199)

中图分类号 R285;R961 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0955-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.22

摘要 目的:研究辣蓼提取物对大鼠急性胃黏膜损伤(AGML)的保护作用。方法:将48只大鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性组(盐酸雷尼替丁,0.05 g/kg)和辣蓼提取物低、中、高剂量组(以生药量计分别为2.7、8.1、24.3 g/kg),连续灌胃给药7 d,每天1次。末次给药1 h后,除正常组外,其余各组大鼠均灌胃无水乙醇复制AGML模型。造模1.5 h后,计算各组大鼠胃黏膜损伤指数,观察大鼠胃组织病理学变化,采用酶联免疫吸附法测定大鼠胃组织中核因子E2相关因子2(Nrf2)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果:与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜损伤明显,黏膜下层毛细血管破裂出血,胃黏膜损伤指数显著升高($P<0.01$);胃组织中Nrf2含量和SOD活性显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠胃黏膜的损伤均不同程度减轻;阳性组和辣蓼提取物中、高剂量组大鼠胃黏膜损伤指数显著降低($P<0.05$),胃组织中Nrf2含量和SOD活性显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:辣蓼提取物对无水乙醇致大鼠AGML具有较好的保护作用,其机制可能与提高胃黏膜组织中Nrf2含量和增强SOD活性有关。

关键词 辣蓼提取物;急性胃黏膜损伤;核因子E2相关因子2;超氧化物歧化酶;大鼠

Study on Protective Effects of *Polygonum hydropiper* Extract on Acute Gastric Mucosal Injury in Rats

REN Shouzhong¹, SU Wenqin¹, ZHU Hongrui², WANG Ning¹, NIU Haiyan³, ZHAO Yamei¹, MA Zhijian⁴ (1.School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 2.School of International Nursing, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 3.Dept. of Pathology, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 4.Dept. of Anatomy and Research, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of *Polygonum hydropiper* extract on acute gastric mucosal lesion (AGML) in rats. METHODS: 48 rats were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), positive group (ranitidine hydrochloride, 0.05 g/kg), *P. hydropiper* extract low-dose, medium-dose and high-dose groups (2.7, 8.1, 24.3 g/kg by crude drug), i.g. for consecutive 7 d, once a day. Except for normal group, other groups were given absolute ethyl alcohol to induce AGMI model after 1 h of last administration. 1.5 h after modeling, gastric mucosal lesion index of rats was calculated; the pathological changes of gastric tissue in rats were observed; nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) content and SOD activity in gastric tissue of rats were determined by ELISA. RESULTS: Compared with normal group, the gastric mucosa of model group was damaged obviously, there was blood capillary rupture in submucosa, gastric mucosal lesion index was increased significantly ($P<0.01$); Nrf2 content and SOD activity were significantly decreased in gastric tissue of rats ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, gastric mucosal lesion of rats was relieved to different extent; in positive group, *P. hydropiper* extract medium-dose and high-dose groups, gastric mucosal lesion index was decreased significantly ($P<0.05$), and Nrf2 content and SOD activity were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: *P. hydropiper* extract has good protective effect on absolute ethyl alcohol-induce AGMI, the mechanism of which may be associated with raising Nrf2 content and enhancing SOD activity in gastric mucosal tissue.

KEYWORDS *Polygonum hydropiper* extract; Acute gastric mucosal lesion; Nuclear factor E2 related factor 2; SOD; Rats

辣蓼为蓼科(Polygonaceae)蓼属植物辣蓼(*Polygonum hydropiper* Linn.)的干燥全草,也称水蓼、蓼芽菜、柳

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81760788);海南医学院引进人才科研启动经费资助项目

*教授,博士。研究方向:中药药理和毒理。电话:0898-31350722。E-mail:540877323@qq.com

#通信作者:教授。研究方向:动物模型。电话:0898-31350722。E-mail:mazhijian2000@126.com

蓼,其味辛、酸,性温,具有祛风利湿、解毒消肿、散瘀止痛、杀虫止痒等功效,主治风湿性关节痛、疥癣、胃肠炎、功能性子宫出血、痢疾、腹泻、脚气和跌打肿痛等^[1],其主要含黄酮和倍半萜和酚酸类成分。药理研究表明,辣蓼具有广谱的抗菌以及抗炎、抗氧化、抗腹泻等作用^[2-3],在临床上用于治疗急、慢性胃肠炎,具有良好疗效。研究表明^[4-5],在急性胃黏膜损伤(AGML)的发生发展过程中

氧自由基参与并发挥了重要作用,过量自由基会引起脂质过氧化及共价键结合,从而造成胃黏膜损伤。超氧化物歧化酶(SOD)能清除自由基,减轻过量自由基引起的损伤。核因子E2相关因子2(Nrf2)是调节体内氧化应激状态的关键性因子,其通过激活机体内源性抗氧化应激通路,保护胃黏膜免受氧化应激损害^[6]。故本研究旨在观察辣蓼提取物对大鼠AGML的改善作用,并通过考察胃组织中Nrf2含量和SOD活性对其可能的作用机制进行探讨,为防治胃肠疾病中药的研发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

TP-1200C电子天平(湘仪天平仪器设备有限公司);TGL-16G台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DZF-6020真空干燥箱(上海申贤恒温设备厂);T25电动匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);MK3酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];BH-2光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸雷尼替丁胶囊(石家庄四药有限公司,批号:LN140967,规格:0.15 g/粒);SOD、Nrf2试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20160428、20160503);甲醇(广东光华科技股份有限公司,批号:20140919,分析纯);无水乙醇(西陇化工股份有限公司,批号:15070702,纯度:99.5%)。

1.3 药材

辣蓼于2016年5月采自海南省,经海南医学院药学院曾念开老师鉴定为蓼科蓼属草本植物辣蓼(*Polygonum hydropiper* Linn.)的干燥全草。

1.4 动物

SD大鼠48只,清洁级,♀♂各半,体质量(180±20)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司[动物生产许可证号:SCXK(湘)2014-0011]。购入后将大鼠饲养于室温为25~27℃的动物房中,饲养期间自由进食饮水,适应性饲养3 d后用于实验。

2 方法

2.1 辣蓼提取物的制备

取辣蓼药材1 kg,粉碎成粗粉,加10倍量水浸泡2 h,然后加热煮沸2 h,滤过,收集滤液;滤渣加8倍量水加热煮沸1.5 h,滤过,收集滤液;滤渣继续加6倍量水加热煮沸1 h,滤过。合并3次滤液,浓缩,即为辣蓼水提液。取一定量辣蓼水提液上AB-8大孔吸附树脂,先用蒸馏水洗脱,然后用70%乙醇洗脱,收集70%乙醇洗脱液,即得。

2.2 分组与给药

将48只大鼠按体质量随机分为6组,分别为正常组、模型组、阳性组和辣蓼提取物低、中、高剂量组,每组8只。正常组和模型组大鼠灌胃生理盐水,阳性组大鼠

灌胃盐酸雷尼替丁水溶液0.05 g/kg(根据成人临床用量按照换算系数法换算而得),辣蓼提取物低、中、高剂量组大鼠分别灌胃辣蓼提取物(以生药量计分别为2.7、8.1、24.3 g/kg,其中低剂量为成人临床用量按照换算系数法换算而得,各组大鼠均每天给药1次,连续给药7 d)。

2.3 AGML模型的制备

末次给药前,各组大鼠均禁食不禁水24 h。末次给药后1 h,除正常组以外,其余各组大鼠均灌胃无水乙醇(1.5 mL/只)诱导AGML^[7]。

2.4 胃黏膜损伤指数的测定

造模1.5 h后,脱颈处死大鼠,打开腹腔,取出全胃,沿着胃大弯剪开,用生理盐水冲洗胃内容物,吸水纸吸干,将胃平铺于试纸上,置于10倍放大镜下肉眼观察,用游标卡尺测量胃黏膜损伤长度和宽度,分级计分^[8]:斑点糜烂≤1 mm,计1分;1 mm<损伤长度≤2 mm,计2分;2 mm<损伤长度≤3 mm,计3分;3 mm<损伤长度≤4 mm,计4分;损伤长度>4 mm,分段计分;宽度≥2 mm则计分加倍。累计得分即为胃黏膜损伤指数。

2.5 胃组织病理形态学的观察

将胃组织置于4%中性福尔马林中固定,石蜡包埋,4 μm切片,苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察大鼠胃组织病理形态学变化。

2.6 胃组织中Nrf2含量和SOD活性的测定

取胃组织用滤纸拭干,称质量,剪碎,放入5 mL离心管中,取9倍量冰生理盐水于离心管中,用组织匀浆机充分研磨制成10%组织匀浆,然后以5 000×g离心10 min,取上清,备用。采用酶联免疫吸附法检测胃组织中Nrf2含量和SOD活性,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。

2.7 统计学方法

采用SPSS 16.0统计学软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 胃黏膜损伤指数测定结果

与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜损伤严重,胃黏膜损伤指数明显升高($P < 0.01$),提示AGML大鼠模型制备成功。与模型组比较,阳性组和辣蓼提取物中、高剂量组大鼠胃黏膜损伤减轻,胃黏膜损伤指数明显降低($P < 0.05$),结果见表1。

3.2 胃组织病理学观察结果

正常组大鼠胃黏膜层光滑完整、结构层次清晰,黏膜下层及肌层完好。模型组大鼠黏膜破损、不完整,部分腺体被破坏;黏膜下层内毛细血管破裂出血及渗出。辣蓼提取物低剂量组大鼠黏膜表层不完整,部分脱落。阳性组和辣蓼提取物中、高剂量组大鼠黏膜层完整,腺体细胞排列比较整齐;黏膜下层及浆膜层基本完整,各组大鼠胃组织病理学观察结果见图1。

表1 各组大鼠胃黏膜损伤指数测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Determination of gastric mucosal injury index of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,g/kg	胃黏膜损伤指数
正常组		
模型组		27.83 ± 6.34**
阳性组	0.05	11.40 ± 5.22 [#]
辣蓼提取物低剂量组	2.7	21.40 ± 5.31
辣蓼提取物中剂量组	8.1	16.00 ± 3.66 [#]
辣蓼提取物高剂量组	24.3	13.33 ± 3.52 ^{##}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$,

^{##} $P < 0.01$

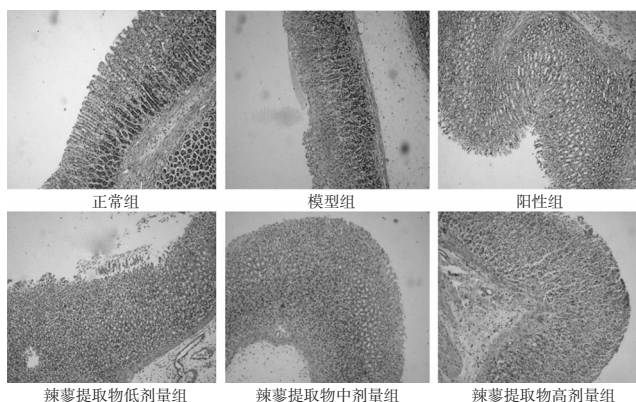


图1 各组大鼠胃组织病理学观察结果(HE染色,×200)

Fig 1 Pathological of gastric tissue of rats in each group(HE staining, ×200)

3.3 胃组织中Nrf2含量和SOD活性测定结果

与正常组比较,模型组大鼠胃组织中Nrf2含量和SOD活性均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,辣蓼提取物中、高剂量组大鼠胃组织中Nrf2含量明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),阳性组和辣蓼提取物中、高剂量组大鼠胃组织中SOD活性均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中以辣蓼提取物高剂量组升高最为显著,结果见表2。

表2 各组大鼠胃组织中Nrf2含量和SOD活性测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Determination results of Nrf2 content and SOD activity in gastric tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,g/kg	Nrf2,ng/mL	SOD,U/mg prot
正常组		1.86 ± 0.62	137.35 ± 15.88
模型组		0.69 ± 0.18**	96.80 ± 42.07*
阳性组	0.05	0.81 ± 0.14	132.30 ± 41.42 [#]
辣蓼提取物低剂量组	2.7	0.78 ± 0.36	118.91 ± 29.53
辣蓼提取物中剂量组	8.1	1.06 ± 0.50 [#]	131.90 ± 27.62 [#]
辣蓼提取物高剂量组	24.3	1.91 ± 0.89 ^{##}	142.86 ± 23.08 ^{##}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group,

[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

4 讨论

引起胃黏膜损伤的因素众多,主要原因是由于胃黏膜防御因子和损伤因子的平衡消失^[9-11]。乙醇是引发胃黏膜损伤的重要攻击因子之一,进入人体后的乙醇大约有20%以上的乙醇在胃部吸收,其能直接损伤胃黏膜和破坏胃黏膜屏障而导致胃黏膜损伤^[12]。本研究采用无水乙醇诱导大鼠AGML,研究辣蓼提取物对AGML的防治作用。病理结果显示,模型组大鼠黏膜损伤明显,部分腺体被破坏;黏膜下层内毛细血管破裂出血及渗出。辣蓼提取物中、高剂量组大鼠胃黏膜层基本完整,腺体细胞排列比较整齐,黏膜下层及浆膜层较完好,且胃黏膜损伤指数显著降低,而辣蓼提取物低剂量组大鼠胃黏膜破坏仍明显,部分黏膜腺脱落,这说明中、高剂量辣蓼提取物能明显减轻无水乙醇所致大鼠胃黏膜损伤。

SOD是机体内一种重要的内源性氧自由基清除剂,能有效地清除氧自由基,抑制胃黏膜中的脂质过氧化反应,并能稳定细胞膜,起到保护胃黏膜的作用^[13],故机体内环境中SOD活性的高低可间接性地反映机体清除自由基的能力。由表2结果可知,辣蓼提取物中、高剂量组大鼠胃组织中SOD活性较模型组明显升高,这表明中、高剂量辣蓼提取物能增强胃黏膜损伤大鼠的抗氧化能力,进而抑制胃黏膜损伤的发生和发展,这可能是其抗胃溃疡的机制之一。Nrf2是氧化应激中抗氧化基因表达的关键转录调控因子,当机体处于氧化应激状态时,可促使Nrf2与Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)解离和释放^[14],然后转位进入细胞核,与Maf蛋白形成异二聚体,后者再与抗氧化反应元件(ARE)结合后启动下游抗氧化酶和II相解毒酶基因的表达,从而提高细胞抗氧化应激和解毒的能力^[15]。本研究结果表明,辣蓼提取物中、高剂量组大鼠胃组织中Nrf2含量较模型组明显升高,这提示中、高剂量辣蓼提取物可通过提高Nrf2水平,促进下游抗氧化酶基因的表达,增强胃黏膜的抗氧化能力。

综上所述,辣蓼提取物对无水乙醇诱导的大鼠AGML有一定的保护作用,其机制可能与升高胃组织中Nrf2含量和增强SOD活性,促进活性氧的清除,增强胃黏膜的抗氧化能力相关,但其对抗氧化基因表达的影响以及相互关系还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 黄红泓,甄汉深.中草药辣蓼近年来的研究进展[J].中国民族民间医药,2013,22(1):38-40.
- [2] 杨新周,郝志云,朱以常,等.辣蓼不同部位的抗氧化活性[J].江苏农业科学,2014,42(2):284-285.
- [3] 曾维爱,谭济才,谭琳,等.辣蓼的应用及其功效[J].中国农学通报,2006,22(8):369-372.
- [4] 罗永祥,彭燕.乙醇对胃粘膜损伤的机制研究概况[J].西南军医,2011,13(1):122-123.
- [5] 刘世艳,杨勇,古春昱,等.乙醇性胃黏膜损伤相关机制的研究进展[J].中国实验诊断学,2013,17(10):1928-1930.
- [6] SUZUKI T, MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway trends[J].

藏药小檗皮的醇提工艺优化研究^Δ

郝露*,周珍,冯慧,赵娅,周邦华,范刚,赖先荣*(成都中医药大学民族医药学院,成都 611137)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0958-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.23

摘要 目的:优化小檗皮的醇提工艺。方法:以小檗皮中木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量和浸膏量为评价指标,采用均匀设计-综合评分法考察乙醇用量、乙醇体积分数、提取时间对提取工艺的影响;采用3次均匀设计试验分别对第1次、第2次、第3次的提取工艺进行考察,分别确定3次提取试验各自的优化工艺并进行验证试验,计算转移率。结果:最优工艺为取小檗皮粗粉加入15倍量75%乙醇,回流提取2次,每次提取120 min。验证试验中,小檗皮按优化工艺提取2次后木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量分别为58.96、4.82、3.07、23.29 mg/g,转移率分别为93.85%、95.02%、96.28%、94.88%(RSD分别为3.87%、2.64%、4.00%、3.91%, $n=3$)。结论:优化的小檗皮乙醇回流提取工艺合理、可行,稳定性好。

关键词 藏药;小檗皮;乙醇提取物;均匀设计法;提取工艺

Study on Extraction Technology Optimization of Tibetan Medicine Cortex of *Berberis dictyophylla* by Ethanol

HAO Lu, ZHOU Zhen, FENG Hui, ZHAO Ya, ZHOU Banghua, FAN Gang, LAI Xianrong (College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize extraction technology of cortex of *Berberis dictyophylla* by ethanol. METHODS: Using the contents of magnoflorine, jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride, the amount of extract as evaluation indexes, the effects of ethanol amount, volume fraction of ethanol and extraction time on extraction technology were investigated by uniform design method-comprehensive scoring method. The extraction methods of first time, second time and third time were investigated by 3 times of uniform design test. The optimal schemes of 3 times of extraction test were determined and validation test was conducted, and the transfer rates were calculated. RESULTS: The optimal technology was as follows as coarse powder of cortex of *B. dictyophylla*, 15-fold 75% ethanol, extracting for 2 times, 120 min each time. In validation test, the contents of magnoflorine, jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride were 58.96, 4.82, 3.07, 23.29 mg/g after *B. dictyophylla* was extracted by optimization technology for 2 times. The transfer rates were 93.85%, 95.02%, 96.28%, 94.88%, respectively (RSD=3.87%, 2.64%, 4.00%, 3.91%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimal ethanol reflux extraction technology of cortex of *B. dictyophylla* is reasonable and feasible with good stability.

KEYWORDS Tibetan medicine; Cortex of *Berberis dictyophylla*; Ethanol extract; Uniform design method; Extraction technology

- Pharmacol Sci, 2013, 34(6):340-346.
- [7] 邱红梅,赖舒,尚京川,等.石榴皮鞣质对大鼠乙醇性胃黏膜损伤的保护作用研究[J].中国药房,2012,23(27):2509-2512.
- [8] 赵洁,童笑梅.丹参对幼鼠应激性溃疡预防作用的实验研究[J].中国当代儿科杂志,2005,7(6):523-525.
- [9] 古学文,廖永州.疏肝健脾活血法对胃溃疡患者胃黏膜表皮生长因子及受体表达的影响[J].广州中医药大学学报,2010,27(2):113-115.
- [10] 张双霞,李光迪,于晓辉,等.根除幽门螺杆菌对慢性胃炎和胃溃疡组织中 MIF 蛋白表达的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2009,30(6):724-728.
- [11] KIM JJ, KIM N, LEE BH, et al. Risk factors for development and recurrence of peptic ulcer disease[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2010, 56(4):220-226.
- [12] 何绍珍,任建林.乙醇对胃黏膜作用机制的研究进展[J].世界华人消化杂志,2005,13(21):259-261.
- [13] 苏静怡.病理生理学[M].北京:北京医科大学中国协和医学院联合出版社,1997:135-139.
- [14] SATOH T, MCKERCHER SR, LIPTON SA. Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of proelectrophilic drugs[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66(8):45-51.
- [15] MERCADO N, KIZAWA Y, UEDA K, et al. Activation of transcription factor Nrf2 signaling by the shingosine kinase inhibitor SKI- II is mediated by the formation of Keap1 dimers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88168-e88175.
- (收稿日期:2017-10-09 修回日期:2017-11-17)
(编辑:林静)