

黄芪-葛根药对保护吲哚美辛诱导的大鼠胃黏膜损伤的作用研究

林静瑜^{1,2}, 黄可儿³, 李书敏², 田 丹¹, 程佑民¹ (1. 福建省中医药研究院, 福建 福州 350003; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 3. 广东省中医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨黄芪-葛根药对对吲哚美辛诱导的大鼠胃黏膜损伤的保护作用。**方法** 取 SD 大鼠, 按体重随机分为正常组、模型组、阳性药组(西咪替丁 12 mg·kg⁻¹·d)、黄芪-葛根药对高、中、低剂量组(24, 12, 6 g·kg⁻¹·d), 连续灌胃 4 d, 第 4 天给药后 75 min, 除正常组外, 其余各组均腹腔注射吲哚美辛混悬液 35 mg·kg⁻¹造模, 6 h 后检测胃黏膜损伤分数、胃黏膜病理学改变, 检测胃黏膜组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧自由基(ROS)的水平。**结果** 模型大鼠胃黏膜出血、糜烂、损伤明显, 胃黏膜组织 ROS、MDA 含量上升, SOD 活力下降; 黄芪-葛根药对各剂量组能不同程度地改善模型大鼠胃黏膜外观、病理学的变化, 降低胃黏膜损伤分数, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 同时, 明显地减少模型大鼠胃黏膜组织 MDA、ROS 含量, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 黄芪-葛根药对高剂量能明显提高 SOD 活力, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 黄芪-葛根药对对吲哚美辛诱导的大鼠胃黏膜损伤有一定保护作用, 其作用可能与抗胃黏膜组织氧化应激水平有关。

关键词: 黄芪-葛根药对; 吲哚美辛; 胃黏膜损伤; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码:

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2017. 0

Effect of Huangqi-Gegen Water Decoction Protecting Indomethacin-induced Gastric Mucosa Injury in Rats

Abstract: **Objective** To explore the protective effect of Huangqi-gegen water decoction on indomethacin-induced gastric mucosa damage of rats. **Methods** SD rats were randomly divided into normal group, model group, the positive group (cimetidine 12 mg·Kg⁻¹·d, ig), huangqi-gegen water decoction high, medium and low dose group (24, 12, 6 g·Kg⁻¹·d, ig) according to weight. Each groups were continuous intragastric administrated 4 days, at the last day, 75 minutes after drug administration, all rats except normal group were intraperitoneal injected indomethacin (35 mg·Kg⁻¹) to induce gastric mucosa injury. 6 hours after indomethacin treatment, the animals were euthanatized and the stomachs were collected. The mucosal injury was scored as ulcer index, the content of SOD, ROS and MDA in mucosal tissue were detected. **Results** The gastric mucosa injury of model group was more serious than another groups. In comparison to rest groups, the content of ROS and MDA of gastric mucosal organization of model group rats were increased, whereas SOD were decreased; Huangqi-gegen water decoction high, middle and low dose not only improved the gastric mucosa pathological damage in different degrees, but also reduced the gastric mucosal injury score (vs the model group, $P < 0.01$ or < 0.05); In addition, the three dose of huangqi-gegen water decoction corrected the rising levels of MDA and ROS in gastric mucosal tissue of model group rats (vs the model group, $P < 0.01$ or < 0.05) in different degrees, and high dose of huangqi-gegen water decoction increased the vitality of SOD (vs the model group, $P < 0.05$). **Conclusion** Huangqi-gegen water decoction has a protective effect on indomethacin-induced gastric mucosa injury, the effect may be related to resistance to oxidant stress.

Keywords: Huangqi-Gegen Water Decoction; Indomethacin; Gastric mucosal injury; Oxidative stress

收稿日期: 2016-09-10

作者简介: 林静瑜, 女, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 中药防治胃黏膜损伤的研究。Email: jingyul2012@163.com。通信作者: 黄可儿, 女, 研究员, 研究方向: 中医药防治脾胃疾病的研究。Email: hke8989@163.com。

基金项目: 广东省省级科技计划项目(20138090600020); 福建省属公益类科研院所专项(2016R1033-1)。

黄芪、葛根是李东垣治疗脾胃病之大法“补中升阳”的常用药物,两味中药兼具有补脾胃之气、升清阳,生津、托毒解肌的功效,黄芪-葛根药对始见于《证治汇补》中的黄芪葛根汤,以“黄芪一两,葛根五钱”,主治“酒郁、内热恶寒”。课题组临床上将黄芪-葛根药对用于胃黏膜损伤性疾病疗效显著,实验研究^[1]也证实了黄芪-葛根药对有一定的保护乙醇诱导的胃黏膜损伤的作用。氧自由基损伤是多种胃黏膜损伤的重要机制之一,现代药理研究^[2-4]表明,黄芪、葛根、黄芪葛根汤均具有较好的抗氧化应激作用。我们推测,黄芪-葛根药对对胃黏膜的保护作用可能与抗氧化作用有关。本研究拟采用吡啶美辛诱导的大鼠胃黏膜损伤模型,进一步探讨黄芪-葛根药对保护胃黏膜损伤的作用及其与胃黏膜组织氧化应激水平的关系。

1 材料与方法

1.1 动物 SD大鼠,雄性,SPF级,48只,体质量180~210 g,购自福建医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(闽)2012-0001,动物设施许可证号:SYXK(闽):2014-0005。

1.2 药物 黄芪:产地甘肃,广东天诚中药饮片有限公司,批号:150901,一次性购于广州中医药大学第一附属医院药房;葛根:产地安徽亳州,一次性购于北京同仁堂亳州饮片有限公司,批号:501003237。以上两味药材经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室车苏容副教授鉴定为内蒙古膜荚黄芪、野葛。黄芪-葛根药对的组成及制备^[2]:按照黄芪:葛根为3:1的比例,取适量黄芪、葛根药材,加10倍蒸馏水,浸泡30 min,武火煎3 min,改用文火保持微沸继续煎至30 min结束,倒出,四层纱布过滤,重复煎2次,合并滤液,水煎挥发浓缩为2,1,0.5 g·mL⁻¹高、中、低3个浓度,4℃下贮存备用;吡啶美辛原料药:SigMa,5 g/瓶,货号:065M4173V,临用时加入5% NaHCO₃溶液中,配制成3.5 mg·mL⁻¹吡啶美辛-NaHCO₃混悬液;西咪替丁注射液,山东方明药业集团股份有限公司,0.1 g·mL⁻¹,批号:1406186,临用时用蒸馏水稀释为10 mg·mL⁻¹西咪替丁溶液,备用。

1.3 试剂 无水乙醇:分析醇,西陇化工股份有限公司,批号:15090802;二甲苯:分析醇,江西强盛功能化学股份有限公司,批号:20140301。苏木素NovocastraTM,批号:6019339;中性树胶,solarbio,

型号:G8590;丙二醛(MDA)试剂盒:A003-1,20160125;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒:A001-3,批号:20160201;活性氧自由基(ROS)试剂盒:E004,批号:20160216;总蛋白定量测试盒(BCA法):A045-3,批号:20160130,以上试剂均为南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器 电子分析天平, METILER, 型号:AE2405;电动组织匀浆器, IKA, 型号:T10BS25;多功能酶标仪, Thermo, 型号:3001;离心机:白洋离心机厂, 型号:BFX5-320;水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司, 型号:DK-420S;光学显微镜, 德国徕卡, 型号:MDL;生物组织自动脱水机, 孝感亚光医用电子技术有限公司, 型号:TS-12U;生物组织石蜡包埋机, 孝感亚光医用电子技术有限公司, 型号:BM-VII;石蜡切片机, 德国徕卡, 型号:RM2235;电热恒温干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司, 型号:DBG-9140A。

1.5 分组、模型制备及给药 取SD大鼠,适应性饲养5 d,按体质量分层分为6组,即正常组、模型组、阳性药组、药对高、中、低剂量组,每组8只。给药方案:正常组、模型组,给予蒸馏水12 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,连续4 d;阳性药组:西咪替丁溶液120 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,连续4 d;药对高、中、低剂量组:分别予高、中、低黄芪-葛根药对水煎液24,12,6 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,各组灌胃体积均为12 mL·kg⁻¹。各组大鼠于第3天给药后开始禁食不禁水24 h,第4天给药75 min后,除正常对照组外,其余各组予35 mg·kg⁻¹吡啶美辛混悬液腹腔注射造模,造模后6 h,依次处死大鼠,剖腹、取胃。

1.6 指标检测

1.6.1 胃黏膜损伤分数计算 取胃后,迅速沿胃大弯剪开,冰生理盐水清洗,将胃展开,置于生理盐水湿润的冰纱布上,先肉眼观察胃黏膜损伤情况,再以电子游标卡尺对损伤部位进行测量。按Guth^[5]改良法计算胃黏膜损伤分数:线性、条索状损伤,测量长度>1 mm,每1 mm计1分,宽度>1 mm则计分加倍;斑状、片状出血按面积计分;点状出血每点计0.5分(长、宽均<0.5 mm)。

1.6.2 胃组织病理学观察 胃黏膜损伤分数观察后,剪取0.5×0.8 cm²胃黏膜组织块,4%多聚甲醛固定24 h,常规石蜡切片包埋,HE染色,光镜下观察病理学变化,拍照。

1.6.3 胃组织SOD、MDA、ROS检测 胃组织病理取

材后，冰上用玻片刮取余下胃黏膜组织，称质量，-80℃冻存，待测。SOD、MDA、ROS测定方法：胃黏膜组织按质量(g)：体积(mL)=1：9的比例，加入9倍体积的生理盐水，冰水浴下用电动匀浆机械匀浆，2500·r·min⁻¹离心10 min，复取上清液再用冰生理盐水稀释成1%匀浆或0.5%匀浆，按照试剂盒说明书上的方法，在多功能酶标仪上进行测定。

1.7 统计学处理方法 实验数据采用SPSS 17.0统计学软件分析，结果以均数±标准差表示，符合正态分布：采用完全随机设计方差分析(One-way ANOVA)，方差齐性，组间比较采用LSD法，方差不齐，采用Dunnett's T3检验；不符合正态分布，采用Mean-Whitney U检验。

2 结果

2.1 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜外观的影响 吡啶美辛 35 mg·kg⁻¹腹腔注射可致大鼠出现较明显的胃黏膜损伤，胃黏膜变薄，部分胃腔内可见凝血块，糜烂积液，经生理盐水轻洗后，可见胃黏膜充血糜烂灶，线状、点状出血，黄芪-葛根药对高、中剂量组、阳性药组胃黏膜损伤程度明显低于模型组，以点状出血为主，伴见糜烂灶。见图1。

2.2 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜组织病理学的影响 光镜下正常大鼠胃黏膜层完整，腺细胞排列均匀，未见出血及炎症细胞浸润；模型组大鼠胃黏膜损伤，可见上皮细胞变性、部分脱落，黏膜层可见点状、线状出血、水肿、炎症细胞浸润；阳性药组、黄芪-葛根药对各剂量组对胃黏膜上皮细胞变性、出血、水肿均有一定的改善作用，以药对高剂量效果尤为

明显。见图2。

2.3 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜损伤分数的影响 吡啶美辛诱导的胃黏膜损伤模型组大鼠损伤分数最高，阳性药组、黄芪-葛根药对高、中、低剂量组能明显降低吡啶美辛诱导的胃黏膜损伤分数，与模型组比较，差异均具有统计学意义(P<0.05，P<0.01)。黄芪-葛根药对3个剂量组间具有一定的量效关系。见表1。

表1 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜损伤分数影响($\bar{x}\pm s$ ，n=8)
Table 1 Gastric mucosal injury score of rats in different groups

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	损伤分数
正常组	-	-
模型组	-	14.87±4.40
阳性药组	0.12	2.79±1.80**
药对高剂量组	24	2.67±1.54**
药对中等剂量组	12	6.60±3.94**
药对低剂量组	6	10.40±3.06*

注：与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

2.4 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜组织MDA、SOD、ROS的影响 吡啶美辛诱导的胃黏膜损伤模型大鼠胃组织MDA、ROS含量明显升高，SOD活力明显下降，与正常组比较，差异有统计学意义(P<0.01)；与模型组比较，黄芪-葛根药对高、中、低剂量组MDA、ROS含量明显降低，差异有统计学意义(P<0.05，P<0.01)；药对高剂量组SOD活力较模型组明显升高，差异有统计学意义(P<0.05)；阳性药组与模型组比较，ROS含量下降、SOD活力上升，差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

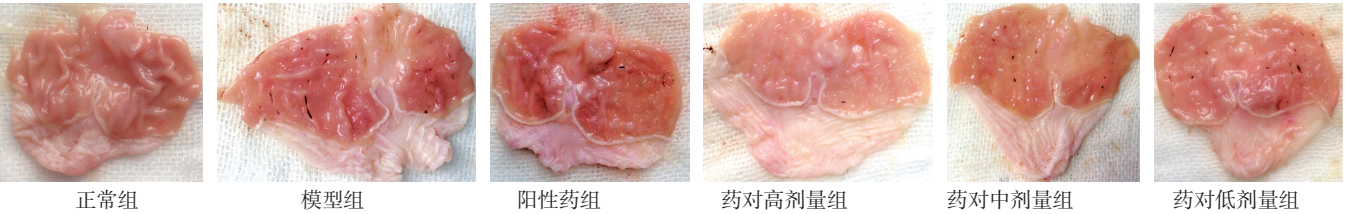


图1 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜外观的影响
Figure 1 The appearance of gastric mucosa of rats in different groups

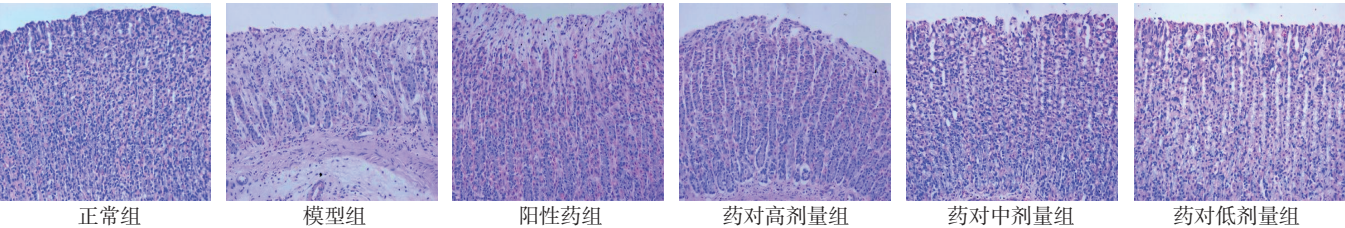


图2 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜组织病理学的影响(HE，200×)
Figure 2 The pathology of gastric mucosa of rats in different groups(HE，200×)

表 2 黄芪-葛根药对对大鼠胃黏膜组织 MDA、SOD、ROS 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 MDA, SOD and ROS in gastric mucosa of rats in different groups

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/U·mg ⁻¹	ROS/荧光强度·mg ⁻¹
正常组	-	500.94 ± 145.43	17.57 ± 1.36	507.05 ± 83.33
模型组	-	719.73 ± 131.07 ^{△△}	13.79 ± 2.59 ^{△△}	685.37 ± 127.17 ^{△△}
阳性药组	0.12	663.81 ± 94.61	15.79 ± 2.45 [*]	564.61 ± 170.23 [*]
药对高剂量组	24	581.24 ± 135.45 [*]	16.16 ± 1.57 [*]	567.14 ± 66.71 [*]
药对中剂量组	12	579.84 ± 138.39 [*]	14.32 ± 1.03	503.44 ± 94.58 ^{**}
药对低剂量组	6	594.39 ± 132.31 [*]	15.70 ± 1.22	535.23 ± 55.04 ^{**}

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

3 讨论

前期研究^[1,6]发现，黄芪-葛根药对、黄芪甲苷对乙醇性胃黏膜损伤具有保护作用，其机制可能与抗凋亡作用有关，并优选出黄芪-葛根药对保护乙醇诱导的胃黏膜损伤最佳配伍比为黄芪：葛根为 3：1，最佳水煎工艺为煎 3 次，每次 30 min，加 10 倍水量，本研究黄芪-葛根药对按此配伍比及水煎工艺。

乙醇及非甾体抗炎药(NASIDs)诱导的胃黏膜损伤模型均是经典的化学损伤胃溃疡动物模型。相较而言，前者诱导的胃黏膜损伤模型与人类胃溃疡的组织学特征，愈合、复发过程更相似，而后者更贴近临床胃溃疡的发病因素^[7]。为了能够较为全面评价黄芪-葛根保护胃黏膜的作用，本文选择常见的吲哚美辛胃黏膜损伤模型作为研究对象。氧自由基损伤是乙醇性、非甾体抗炎药等多种胃黏膜损伤重要机制之一^[8]，除了抑制内源性前列腺素(PG)合成导致胃黏膜的损伤外，氧自由基的损伤在 NSAID 胃病亦起着重要作用，一方面 NASIDs 可引起线粒体氧化磷酸化脱偶联，导致线粒体损伤，胞内 ATP 减少，膜通透性增大，引起钙漏出，继而启动一系列的氧化应激反应^[9]；另一方面，NASIDs 还可诱导中性粒细胞的粘附、活化，释放氧自由基和蛋白酶，攻击胃黏膜组织^[10]。研究报道^[11]，经抗 CD18 中性粒细胞粘附抗体或地塞米松预处理后，吲哚美辛所致的兔胃肠黏膜损伤明显减轻。目前一般认为，NASIDs 胃黏膜损伤氧自由基主要来自白细胞，酒精性胃黏膜损伤氧自由基可能主要来自醛氧化酶。

自由基清除剂是目前治疗胃黏膜损伤的常用药物之一，黄芪、葛根及其有效成分均具有较好的抗氧化应激作用，前期我们主要从凋亡抑制方面探讨黄芪-葛根药对保护胃黏膜损伤的作用机理，本研

究侧重考察黄芪-葛根药对保护胃黏膜与其抗氧化作用的相关性。实验结果显示：黄芪-葛根药对能够减轻吲哚美辛诱导的大鼠胃黏膜损伤、降低吲哚美辛所致的胃黏膜组织 MDA、ROS 含量的升高，提高 SOD 活力。

中药及其复方的成分复杂，药理效应较广泛，作用靶点较模糊，是其作用机制难以明确的主要原因之一。黄芪、葛根及其有效成分除了其相似的抗氧化、凋亡抑制等药理作用外，还具有各自的药理特性如黄芪的免疫调节，葛根的解酒、扩张血管作用等，黄芪-葛根药对这种保护胃黏膜作用可能是其多个成分作用于不同的靶点，在胃黏膜损伤的不同机制层面交互作用的结果，具体作用机制还有待于下一步深入探讨。

总之，本研究结果表明：黄芪-葛根药对对吲哚美辛诱导的大鼠胃黏膜损伤具有一定的保护作用，其作用机理可能与抗氧化有关。

参考文献：

- [1] 来慧丽，林静瑜，桂雪虹，等. 正交试验优选黄芪葛根汤保护胃黏膜的水煎工艺[J]. 中药新药与临床药理，2015，26(1)：117-120.
- [2] 裴志萍，牛文革，柴静波，等. 黄芪预处理对大鼠肠系膜缺血再灌注损伤后氧化应激和炎症反应的抑制作用[J]. 中国中医急症，2016，25(6)：967-970.
- [3] Han Ping, Wu De-sheng, Li Wen-jie, et al. 葛根粗提物及葛根素对乙醇所致海马细胞 HSP70 表达的影响[J]. 中华医学杂志 (Zhonghua yi xue za zhi.), 2005，85(41)：2930-2933.
- [4] 陈艳芬，王春怡，李卫民，等. 黄芪葛根汤对糖尿病心脏病大鼠氧化应激和 NF- κ B 表达的影响[J]. 中成药，2012，34(8)：1428-1432.
- [5] PH Guth, D Aures, G Paulsen. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine[J]. Gastroenterology, 1979, 76(7)：88-93.
- [6] 来慧丽. “黄芪-葛根”药对对乙醇诱导的胃黏膜损伤的保护[D]. 广州中医药大学博士论文，23-27，2015.
- [7] 肖韦，许昂，季晖. 胃溃疡药理模型的研究进展，药学与临床研究[J]. 2016，24(2)：145-149.
- [8] 李兆申，湛先保，许国铭. 胃黏膜损伤与保护-基础与临床[M]. 上海，上海科学技术出版社，2004：121-126.
- [9] T Mahmud, DL Scott, I Bjarnason. A unifying hypothesis for the mechanism of NSAID related gastrointestinal toxicity[J]. Annals of the rheumatic diseases, 1996, 55(4)：211-213.
- [10] H Asako, P Kubes, J Wallace, et al. Modulation of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate [J]. Gastroenterology, 1992, 103(1)：146-152.
- [11] JL Wallace, KE Arfors, GW McKnight. A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit[J]. Gastroenterology, 1991, 100(4)：878-883.

(编辑：宋威)