

海南砂仁对醋酸致大鼠胃溃疡的保护作用及机制研究

邓海丹¹, 张大维¹, 朱虹¹, 屈晓博¹, 陈锦发¹, 秦贞苗¹, 董琳^{1,2}

1.海南医学院药学院, 海南 海口 571199;

2.海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海南 海口 571199

【摘要】 目的 研究海南砂仁醇提物对大鼠醋酸性胃溃疡的保护作用及机制。方法 40只Wistar大鼠按照双盲法随机均分成正常对照组、胃溃疡模型组、枸橼酸铋雷尼替丁组、海南砂仁醇提物高、低剂量组, 每组8只。大鼠胃壁肌层注射冰醋酸诱导胃溃疡模型。造模后1d, 枸橼酸铋雷尼替丁组给予枸橼酸铋雷尼替丁0.16 g/(kg·d); 海南砂仁醇提物高、低剂量组分别给予海南砂仁醇提物1.25 g/(kg·d)和0.25 g/(kg·d); 对照组和模型组灌胃生理盐水; 连续给药14d。末次给药后1h, 结扎胃幽门, 收集19h内分泌胃液, 然后处死大鼠, 取胃组织、血液。测定胃液pH值和胃蛋白酶活性, 计算胃溃疡指数, ELISA法测定血清肿瘤坏死因子(TNF- α)、前列腺素E2 (PGE2)及胃黏膜的氨基己糖、三叶因子1 (TFF1)的水平, HE染色观察胃组织病理变化。结果 模型组大鼠的胃液pH值、胃蛋白酶活性、血清TNF- α 水平[(2.06 \pm 0.43)、(407.50 \pm 100.17) U/mL、(534.80 \pm 167.31) ng/L]明显高于海南砂仁醇提物高剂量组[(2.53 \pm 0.40)、(307.50 \pm 26.40) U/mL、(329.13 \pm 82.75) ng/L]及对照组[(2.88 \pm 0.51)、(317.56 \pm 22.55) U/mL、(79.91 \pm 31.43) ng/L], 差异均有统计学意义(P <0.05); 溃疡指数高于海南砂仁醇提物高剂量组[(9.75 \pm 2.96) *vs* (5.75 \pm 2.60)], 差异亦有统计学意义。模型组大鼠的血清PGE2、胃黏膜TFF1和氨基己糖的含量均明显低于海南砂仁醇提物高剂量组以及对照组[PGE2 (72.00 \pm 12.78) ng/L、TFF1 (382.25 \pm 33.71) pg/g、氨基己糖(112.88 \pm 18.86) ng/g *vs* (119.38 \pm 22.87) ng/L、(424.38 \pm 20.81) pg/g、(176.00 \pm 34.94) ng/g *vs* (151.75 \pm 30.36) ng/L、(817.25 \pm 206.50) pg/g、(201.38 \pm 20.83) ng/g], 差异均具有统计学意义(P <0.05)。结论 海南砂仁醇提物对大鼠醋酸性胃溃疡有一定的保护作用, 其机制可能通过提高TFF1的表达, 使胃黏膜氨基己糖含量升高, 从而增强胃黏膜防御屏障的保护能力, 发挥胃黏膜保护功效。

【关键词】 海南砂仁醇提物; 胃溃疡; 肿瘤坏死因子- α ; 前列腺素E2; 三叶因子1; 氨基己糖

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)12-1497-04

Protective effects of *Amomum longiligulare* on acetic-acid induced gastric ulcer in rats and its mechanisms. DENG Hai-dan¹, ZHANG Da-wei¹, ZHU Hong¹, QU Xiao-bo¹, CHEN Jin-fa¹, QIN Zhen-miao¹, DONG Lin^{1,2}. 1. School of Pharmaceutical Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, Hainan, CHINA; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of R & D on Tropical Medicinal Herbs, Haikou 571199, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To study the protective effects and mechanisms of ethanol extract of *Amomum longiligulare* on rat gastric ulcer induced by acetic acid. **Methods** Forty rats were randomly divided into five groups by double blind method: control group, gastric ulcer model group, Ranitidine Bismuth Citrate group, ethanol extract of *A. longiligulare* high-dose (1.25 g/kg) group (high-dose group), ethanol extract of *A. longiligulare* low-dose (0.25 g/kg) group (low-dose group), with 8 rats in each group. The effect of ethanol extract of *A. longiligulare* on gastric mucosal injury was observed in rats gastric ulcer model induced by acetic acid. The second day after the model was established, Ranitidine Bismuth Citrate group was given Ranitidine Bismuth Citrate 0.16 g/(kg·d) by oral gavage, high and low-dose group were respectively given ethanol extract of *A. longiligulare* 1.25 g/(kg·d) and 0.25 g/(kg·d) by oral gavage, and the control group and model groups were given equal amount of saline. The rats were given a continuous administration for 14 days. The gastric pylorus was ligated 1 h after the last administration, and endocrine gastric juice was collected for 19 h. Then the rats were sacrificed and gastric tissue and blood were taken. The effect of ethanol extract of *A. longiligulare* on gastric acid pH, level of pepsin, gastric ulcer index, tumor necrosis factor (TNF- α), prostaglandin E2 (PGE2) in blood plasma, hexosamine, and trefoil factor 1 (TFF1) in gastric mucosa were observed. The stomach tissue pathological slices were also observed. The pathological morphology of gastric tissue was observed by HE staining. **Results** Gastric acid pH, level of pepsin, tumor necrosis factor (TNF- α) were 2.06 \pm 0.43, (407.50 \pm 100.17) U/mL, (534.80 \pm 167.31) ng/L in

基金项目:海南省自然科学基金(编号:20158370);2017年海南省大学生创新创业训练计划项目(编号:2017106);2016年海南医学院大学生创新创业训练计划项目(编号:HYCX2016063)

通讯作者:秦贞苗, E-mail:691173738@qq.com;董琳, E-mail:donglin79@qq.com

model group, significantly higher than 2.53 ± 0.40 , (307.50 ± 26.40) U/ml, (329.13 ± 82.75) ng/L in high-dose group, and 2.88 ± 0.51 , (317.56 ± 22.55) U/ml, (79.91 ± 31.43) ng/L in control group ($P < 0.05$). The gastric ulcer index was 9.75 ± 2.96 in model group, significantly higher than 5.75 ± 2.60 in high-dose group ($P < 0.05$). The PGE2, TFF1, hexosamine were (72.00 ± 12.78) ng/L, (382.25 ± 33.71) pg/g, (112.88 ± 18.86) ng/g in gastric mucosa in model group, significantly lower than (119.38 ± 22.87) ng/L, (424.38 ± 20.81) pg/g, and (176.00 ± 34.94) ng/g in in high-dose group and (151.75 ± 30.36) ng/L, (817.25 ± 206.50) pg/g, and (201.38 ± 20.83) ng/g in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The ethanol extract of *A. longiligulare* can protect the rats from gastric ulcer induced by acetic acid. The mechanism may be related to the high hexosamine content in the gastric mucosa by increasing the expression of TFF1 and enhancing the protective ability of gastric mucosa as a defensive barrier to exert its effect.

【Key words】 Ethanol extract of *Amomum longiligulare*; Gastric ulcer; Tumor necrosis factor (TNF- α); Prostaglandin E2 (PGE2); Trefoil factor 1 (TFF1); Hexosamine

海南砂仁为海南的道地药材,是姜科豆蔻属植物海南砂仁 *Amomum longiligulare* T. L. Wu. 的干燥成熟果实^[1-2],是砂仁的三大正品植物来源之一。砂仁性辛温,芳香,具有行气和胃、温脾止泻的功效。在中医治疗胃肠疾病中应用非常普遍,具有确切的医疗价值^[3]。目前,国内外对砂仁的研究主要集中在对阳春砂仁的挥发油成分及其药理作用方面,而对海南砂仁的药理作用及化学成分研究甚少,因此海南砂仁的抗胃溃疡及胃保护作用机理尚不明确^[4]。本研究采用醋酸致大鼠胃溃疡模型,观察不同剂量海南砂仁醇提物对大鼠胃溃疡的保护作用,并初步探讨其药效学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重(200 \pm 20) g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。许可证号:SCXK(沪)2013-0016。

1.2 主要材料及试剂 海南砂仁药材采自海南省琼中县,由海南医学院药学院曾念开教授鉴定为豆蔻属植物海南砂仁 *Amomum longiligulare* 的果实。枸橼酸铋雷尼替丁片:丽珠集团丽珠制药厂,规格:0.2 g,12 片/盒,生产批号:20160413。胃蛋白酶测定试剂盒(氨基酸还原法):南京建成生物工程研究所,批号:20160829;前列腺素 E2 (PGE2)、血清肿瘤坏死因子(TNF- α)、三叶因子 1 (TFF1)、氨基己糖的 ELISA 检测试剂盒由欣博盛生物提供(批号 20161028)。其余试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器 上海精科 JA5003N 电子天平;科德士宠物专用电推剪:CP-8000;电子数显卡尺:上海量具刀具厂;TP1020 型生物组织脱水机,由 Leica 公司生产;NP-B 型生物组织包埋机,由湖北诺普医疗器械有限公司生产;RM2235 型切片机,由 Leica 公司生产;DMLS2 型显微镜,由 Leica 公司生产;YP1201N 电子天平:上海精密科学仪器有限公司;Canon 数码相机:860IS。

1.4 海南砂仁醇提物的制备 取海南砂仁果实 2.5 kg,破壳粉碎,用 12.5 L 的 95%乙醇冷浸提取 24 h,减压回收得海南砂仁醇提物固形物为 123.7g,得率为 4.9%。

1.5 动物分组、造模与给药 大鼠适应性饲养 1 周后,取 40 只,每组 8 只随机分为对照组、胃溃疡模型组、枸橼酸铋雷尼替丁组、海南砂仁醇提物高、低剂量组。参考文献方法建立醋酸性胃溃疡动物模型^[5-6]:禁食不禁水 24 h 后,以 40%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,腹壁剪毛,常规消毒,于剑突下纵向切开腹壁约 2 cm,将胃轻轻拉出,用微量注射器在胃前壁胃窦部浆膜下近肌层处注入 0.03 mL 的冰醋酸,待出现直径约 3 mm 半透明的白斑后将胃送还腹腔,以大网膜覆盖并分层缝合腹壁。对照组手术操作同上,改注射冰醋酸为注射生理盐水。各组术后次日起给予自由饮食。

术后 1 d 开始灌胃给予各组大鼠相应药物:对照组和模型组灌胃给予生理盐水 10 mL/(kg·d);枸橼酸铋雷尼替丁组给予枸橼酸铋雷尼替丁 0.16 g/(kg·d);海南砂仁醇提物高剂量组给予海南砂仁醇提物 1.25 g/(kg·d);海南砂仁醇提物低剂量组给予海南砂仁醇提物 0.25 g/(kg·d),连续给药 14 d。

1.6 生物样品收集与各项指标的检测 各组大鼠末次给药 1 h 后用水合氯醛麻醉,开腹,迅速结扎幽门,将腹腔切口分层缝合消毒。术后大鼠禁食、禁水 19 h,腹主动脉取血,3 000 r/min 离心 10 min,取血清-20℃保存备用。处死大鼠,将胃取出,用可定量试管小心收集胃液,pH 计测酸度,然后用高速冷冻离心机以 3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液,在-20℃冰箱中分装冷冻待测。将胃沿胃大弯剪开,用生理盐水洗净胃内容物,观察胃黏膜损伤程度、是否充血、溃疡程度等。取胃窦部位溃疡处胃组织 10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色后光镜观察组织学变化。另取剩余胃组织以薄玻片刮下胃黏膜-80℃冰

箱保存,待测氨基己糖和TFF1含量。

1.6.1 溃疡指数和溃疡抑制率的计算 溃疡指数按以下标准计算:解剖显微镜下观察胃黏膜出血、溃疡面的多少、大小及其分布部位,测量各个溃疡的长径,每1 mm记1分,若宽度超过1 mm者将其计分加倍,其总和作为溃疡指数。溃疡抑制率=(模型组溃疡指数-给药组溃疡指数)/模型对照组溃疡指数 \times 100%。

1.6.2 胃液pH值及胃蛋白酶活性测定 取胃液,置于小的烧杯中,用pH计检测胃液pH值。取剩余部分胃液,采用氨基酸还原法,按照胃蛋白酶测定试剂盒说明书步骤测定胃蛋白酶活性。

1.6.3 血清中PEG2、TNF- α 含量和胃黏膜中TFF1、氨基己糖含量测定 取大鼠血清,按试剂盒说明书步骤酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清中PEG2和TNF- α 含量。取大鼠胃黏膜,于电子天平上准确称重,按比例加入预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)匀浆介质制备组织匀浆液,按试剂盒说明书步骤ELISA法检测胃黏膜中氨基己糖和TFF1含量。

1.7 统计学方法 应用SPSS17.0软件进行数据分析,实验计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本均数比较采用ANOVA分析,多组间两两差异比较采用LSD-*t*检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对溃疡指数和溃疡抑制率的影响 与模型组比较,给药海南砂仁醇提取物高剂量组(1.25 g/kg)能显著减少胃溃疡模型大鼠溃疡指数,差异有统计学意义($P<0.05$)。枸橼酸铋雷尼替丁组、海南砂仁醇提取物低剂量组及海南砂仁醇提取物高剂量组对胃溃疡模型大鼠的溃疡抑制率分别为52.56%、23.08%及41.03%,见表1。

表1 海南砂仁醇提取物对胃溃疡大鼠溃疡指数的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	给药剂量 (g/kg)	溃疡指数	溃疡抑制率 (%)
模型组	8	-	9.75 \pm 2.96	-
枸橼酸铋雷尼替丁组	8	0.16	4.63 \pm 1.92 ^a	52.56
海南砂仁醇提取物低剂量组	8	0.25	7.50 \pm 2.78	23.08
海南砂仁醇提取物高剂量组	8	1.25	5.75 \pm 2.60 ^b	41.03
F值			5.922	
P值			0.003	

注:与模型组比较,^a $P<0.01$;^b $P<0.05$ 。

2.2 对胃液pH值和胃蛋白酶活性的影响 与对照组相比,模型组大鼠胃液pH值和胃蛋白酶活性显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),与模型组比较,海南砂仁醇提取物高剂量组(1.25 g/kg)能显著降低胃液pH值和胃蛋白酶活性,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 海南砂仁醇提取物对胃溃疡大鼠胃酸PH值和胃蛋白酶活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	给药剂量 (g/kg)	pH值	胃蛋白酶活性 (U/mL)
对照组	8	0	2.88 \pm 0.51	317.56 \pm 22.55
模型组	8	0	2.06 \pm 0.43 ^a	407.50 \pm 100.17 ^a
枸橼酸铋雷尼替丁组	8	0.16	2.55 \pm 0.36 ^b	248.00 \pm 69.19 ^b
海南砂仁醇提取物低剂量组	8	0.25	2.40 \pm 0.38	350.40 \pm 43.75
海南砂仁醇提取物高剂量组	8	1.25	2.53 \pm 0.40 ^b	307.50 \pm 26.40 ^b
F值			3.039	6.268
P值			0.045	0.002

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 海南砂仁醇提取物对血清PEG2、TNF- α 含量和胃黏膜TFF1、氨基己糖含量的影响 与模型组大鼠比较,海南砂仁醇提取物高剂量组能够显著升高血清PGE2水平,差异有统计学意义($P<0.05$),同时降低血清TNF- α 水平($P<0.01$);显著升高胃黏膜TFF1和氨基己糖的含量,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3和表4。

表3 海南砂仁醇提取物对胃溃疡大鼠血清TNF- α 和PEG2含量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	给药剂量 (mg/kg)	TNF- α (ng/L)	PEG2 (ng/L)
对照组	8	0	79.91 \pm 31.43	151.75 \pm 30.36
模型组	8	0	534.80 \pm 167.31 ^a	72.00 \pm 12.78 ^a
枸橼酸铋雷尼替丁组	8	0.16	324.60 \pm 120.62 ^c	122.25 \pm 17.69 ^b
海南砂仁醇提取物低剂量组	8	0.25	418.14 \pm 259.70	91.63 \pm 23.74
海南砂仁醇提取物高剂量组	8	1.25	329.13 \pm 82.75 ^b	119.38 \pm 22.87 ^b
F值			16.948	15.101
P值			<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$ 。

表4 海南砂仁醇提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜TFF1和氨基己糖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	给药剂量 (g/kg)	TFF1 (pg/g)	氨基己糖 (mg/g)
对照组	8	0	817.25 \pm 206.50	201.38 \pm 20.83
模型组	8	0	382.25 \pm 33.71 ^a	112.88 \pm 18.86 ^a
枸橼酸铋雷尼替丁组	8	0.16	473.13 \pm 38.07 ^b	171.00 \pm 32.57 ^b
海南砂仁醇提取物低剂量组	8	0.25	413.63 \pm 34.96	122.25 \pm 29.39
海南砂仁醇提取物高剂量组	8	1.25	424.38 \pm 20.81 ^b	176.00 \pm 34.94 ^b
F值			27.384	9.825
P值			<0.05	<0.05

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠胃组织的病理学变化 大鼠胃组织病理切片显示:模型组中,大鼠胃黏膜损伤明显,胃黏膜上皮变性坏死,局部溃疡形成,伴有较严重的炎症、出血、水肿;海南砂仁醇提取物低剂量组及高剂量组均见大鼠胃黏膜组织结构正常,胃黏膜损伤较轻,胃组织炎症、出血明显减轻,见图1。

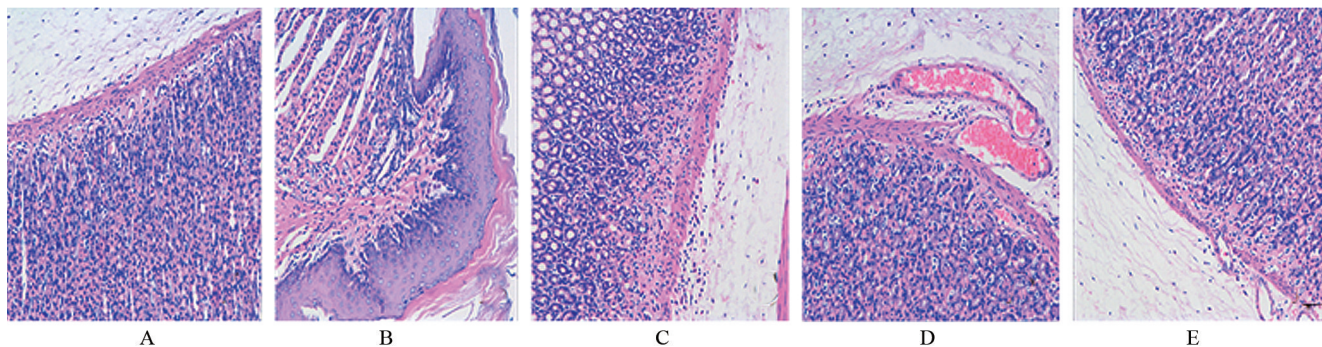


图 1 胃组织病理切片(100×)

注:A,对照组;B,胃溃疡模型组;C,海南砂仁醇提物低剂量组(0.25 g/kg);D,海南砂仁醇提物高剂量组(1.25 g/kg);E,枸橼酸铋雷尼替丁组。

3 讨论

胃溃疡的发病机制主要与胃黏膜的损害因素和黏膜自身防御-修复因素之间失衡有关。TFF1 属于三叶因子家族(TFF),是一类较新的、对胃黏膜有保护作用的因子^[7]。有研究表明,胃黏膜损伤早期 TFF1 可通过表达上调促进黏膜修复,当胃黏膜严重受损, TFF1 不能正常表达而影响损伤黏膜的修复^[8]。TFF1 可明显减轻多种损伤因素介导的胃黏膜损伤,刺激上皮细胞的迁移、增殖,保护黏膜屏障的完整性,在胃肠黏膜的自我保护和损伤后修复机制中占有重要地位。TFF1 对胃黏膜保护作用的机制主要体现在它能与黏液糖蛋白相互作用,形成黏弹性的黏液凝胶层,从而增强胃肠道黏膜防御屏障的保护能力^[9]。黏液凝胶层主要由黏液凝胶内脂类物质(主要为磷脂)和糖蛋白(主要为氨基己糖)组成,当 TFF1 上调时,黏液凝胶层的形成,胃黏膜氨基己糖及磷脂的含量也随之增加。并且, TFF1 也可促进细胞的迁移、增殖或分化,可促进损伤胃黏膜的重建和修复^[10-11]。

实验性醋酸致大鼠胃溃疡模型是一种经典慢性胃溃疡模型,与人类的慢性胃溃疡发生机制及病理组织学形态相似,应用于筛选治疗慢性胃溃疡药物及观察药物治疗效果^[5-6]。本研究首次考察了海南砂仁醇提物对大鼠醋酸慢性胃溃疡的保护作用,结果表明:与模型组大鼠比较,给大鼠灌胃 1.25 g/kg 海南砂仁醇提物能显著抑制胃酸分泌,降低胃蛋白酶活性,显著升高血浆 PGE₂ 水平,显著降低血浆 TNF- α 水平,减少溃疡指数,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明海南砂仁醇提物具有良好的胃黏膜保护作用。并通过 ELISA 检测胃黏膜氨基己糖和 TFF1 含量,发现与模型

组大鼠比较,海南砂仁醇提物高剂量组可使胃黏膜 TFF1 和氨基己糖的含量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示海南砂仁醇提物可能通过提高 TFF1 的表达,使胃黏膜氨基己糖含量增加,从而增强胃黏膜防御屏障的保护能力,这可能是其促进溃疡愈合及其抗复发的机制之一。

参考文献

- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 253.
- 贾敏如, 张艺. 中国民族药辞典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 46
- 张明发, 沈雅琴. 砂仁临床药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2013, 10(1): 8-13.
- 陆山红, 赵荣华, 么晨, 等. 砂仁的化学及药理研究进展[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 227-230.
- 王英. 冰乙酸性大鼠胃溃疡模型制作方法比较[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 21(7): 505-506.
- 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学(第四版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1115.
- 唐保东. 胃黏膜保护剂在胃溃疡治疗中的研究进展[J]. 中国处方药, 2006, 5(50): 39-42.
- 任建林, 何绍珍, 潘金水, 等. 三叶因子 1 在乙醇诱导的大鼠急性胃黏膜损伤中的表达[J]. 胃肠病学, 2008, 13(3): 145-148
- 沈贤敏, 葛惠男. 三叶因子在胃肠疾病中的研究[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(6): 1040-1042.
- HOFFMANN W, JAGLA W. Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain [J]. Int Rev Cytol, 2002, 13: 147-181.
- UEHINO H, KATAOKA H, ITOH H, et al. Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth *in vitro* and *in vivo* [J]. Gastroenterology, 2000, 118(1): 60-69.

(收稿日期: 2018-11-13)