

实验研究

白及须根醇提物抗胃溃疡作用研究^{*}

史珍珍 徐正虹 付宇航 俞杭苏 蒋福升 丁志山^{**}

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 研究白及须根醇提物抗大鼠乙醇急性胃溃疡的活性及其作用机理。方法 实验设正常组、模型组、阳性对照组、白及须根醇提物低、中、高剂量组,用无水乙醇诱导大鼠胃溃疡模型。初次采用扫描仪扫描大鼠胃溃疡情况。ELISA检测血清中IL-1 β 、TNF- α 、IL-10等因子的水平,初步分析其作用机理。结果 白及须根醇提物可以减小溃疡面积;ELISA数据显示,血清中IL-1 β 、TNF- α 、IL-10等因子与模型组相比均有显著性变化。结论 白及须根醇提物具有显著抗胃溃疡作用,须根醇提物组分可通过降低IL-1 β 等因子和提高IL-10、VEGF等因子的水平发挥抗胃溃疡作用。

关键词:白及;须根;胃溃疡;细胞因子

中图分类号: R 573.1 文献标识码: A 文章编号:1002-168X(2015)01-0063-04

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.01.025

Study of Rhizoma Bletillae Fibrous Root Alcohol Extract on Anti Gastric Ulcer

Shi Zhenzhen Xu Zhenghong Fu Yuhang

Yu Hangsu Jiang Fusheng Ding Zhishan

(Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou, Zhejiang, 310053)

Abstract: Objective To study the fibrous root of alcohol extract of Rhizoma Bletillae activity and mechanism of acute gastric ulcer in rat alcohol compounds. The experimental method of normal group, model group, positive control group, Rhizoma Bletillae fibrous root alcohol extract of low, medium and high dose groups, the rat model of gastric ulcer induced by ethanol. The first use of scanner to scan gastric ulcer in rats. ELISA detection of serum IL - 1, TNF - alpha, beta, IL - 10 and other factors level, a preliminary analysis of its mechanism. **Results** Rhizoma Bletillae fibrous root alcohol extract could reduce the ulcer area; ELISA data display, the serum IL - 1, TNF - alpha, beta IL - 10 factors compared with model group, there was significant variation. **Conclusion** Rhizoma Bletillae fibrous root alcohol extract has obvious anti gastric ulcer effect. Fibrous root alcohol extract components can reduce the IL, play the effect of anti ulcer 1 beta factor and improve the IL - 10, VEGF factor level.

Keywords: BRhizoma Bletillae; roots; gastric ulcer; cell factor.

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reiehb. f. 的干燥块茎,能收敛止血,消肿生肌,用于咯血,吐血,外伤出血,疮疡肿毒,皮肤皲裂等^[1]。临床和基础研究表明,白及治疗胃溃疡有效^[2],白及正丁醇萃取物有抗胃溃疡作用^[3],白及中的粘胶类物质是其止血的有效物质^[4-6]。近年,

^{*} 基金项目:浙江省新苗人才计划(2013R410061)

^{**} 通讯作者:丁志山,男,教授,博士研究生导师,浙江中医药大学生命科学院。E-mail:zjtcmdzs@sohu.com。

由于其种子发育不全、种植生态环境恶化及过度采挖等,致使药材供需矛盾凸显^[7]。研究发现,白及块茎附有大量须根,炮制时须将其去除,而白及须根的化学成分与块茎基本一致,而且多数含量还远高于块茎,因此有一定的利用价值^[8]。本文观察了白及须根醇提物对无水乙醇致胃溃疡模型大鼠的影响,为其综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠,雄性,体重 200±20 g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,动物合格证号 SYXK(浙)2003-0003。

1.2 药物与试剂 白及药材,购于江山宝珠农业有限公司,为兰科植物白及 *Bletilla striata*(Thunb.) Reiehb. f. 的干燥体。

白及须根醇提物的制备:称取 10.0 g 白及须根粉末并加入 500 mL 95 % 乙醇冷凝回流并收集滤液。将滤液浓缩至一半体积后加 200 mL 水和 6.0 g 聚酰胺,混匀后蒸馏至无醇味。将其装柱并用蒸馏水洗脱至流出液呈无色。再用 95 % 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压干燥所得样品,即为白及须根醇提物。

氢氧化钠,氯化钠,氯化钾,硫酸镁,磷酸二氢钾,EDTA(国药集团化学试剂有限公司)。无水乙醇(杭州长征化学试剂有限公司),冰醋酸(中国杭州化学试剂有限公司),超氧化物歧化物(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所),丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),IL-1β、IL-10、PAF、VEGF、TNF-αELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)

1.3 器材 精密电子天平(型号:AR520,奥豪斯国际贸易(上海)有限公司);自动平衡离心机(型号:LDZ5-2;北京医用离心机厂);低温冷却液循环泵(型号:DLSB-10/20,郑州长城科工贸有限公司);高效液相色谱仪(型号:Ultimat3000,美国戴安公司);超级恒温水浴(宁波新芝生物科技股份有限公司);酶标仪(北京普朗新技术有限公司)。

1.4 分组、给药及造模^[9] 取 SD 大鼠 48 只,随机分成 7 组,每组 4 雄 4 雌共 8 只。空白对照组灌胃 1 % 吐温-80 水溶液;模型组灌胃 1 % 吐温-80 水溶液;阳性药物组:奥美拉唑胶囊(含有奥美拉唑有效成分为 20 mg/颗),蒸馏水溶解,配成 5 mg/mL 溶液,灌胃给药 50 mg/kg;醇提物低剂量

组:1 % 吐温-80 溶解,灌胃给药 50 mg/kg;醇提物中剂量组:1 % 吐温-80 溶解,灌胃给药 120 mg/kg;醇提物高剂量组:1 % 吐温-80 溶解,灌胃给药 200 mg/kg。

灌胃给药 3 d 后造模,空白对照组除外。

1.4.1 大鼠胃组织出血面积观察 给药最后一天,大鼠禁食不禁水 24 h;最后一次给药 1 h 后灌胃无水乙醇 0.5 mL/100 g 进行胃溃疡造模;1 h 后 10 % 水合氯醛 0.3 mL/100 g 麻醉,腹主动脉取血,-20 ℃ 保存;结扎胃组织贲门和幽门,分离大鼠胃组织,注入 10 % 福尔马林至胃饱胀后整个放入 10 % 福尔马林溶液中浸泡 10-15 分钟;沿胃大弯将胃剪开,用蒸馏水漂洗干净,分别将胃内面朝下贴敷于扫描仪上进行扫描;观察各组胃组织扫描结果。

1.4.2 SD 大鼠血清中 MDA 和 SOD 的测定 腹主动脉取 SD 大鼠血清样本并于-20 ℃ 下保存。按试剂盒说明书方法进行检测。

1.4.3 ELISA 法测定血清中 IL-1β、IL-10、PAF、VEGF、TNF-α 水平变化 腹主动脉取 SD 大鼠血清样本并于-20 ℃ 下保存。按试剂盒说明书方法进行检测。

2 结果

2.1 白及须根醇提物对大鼠胃组织的影响 见图 1。

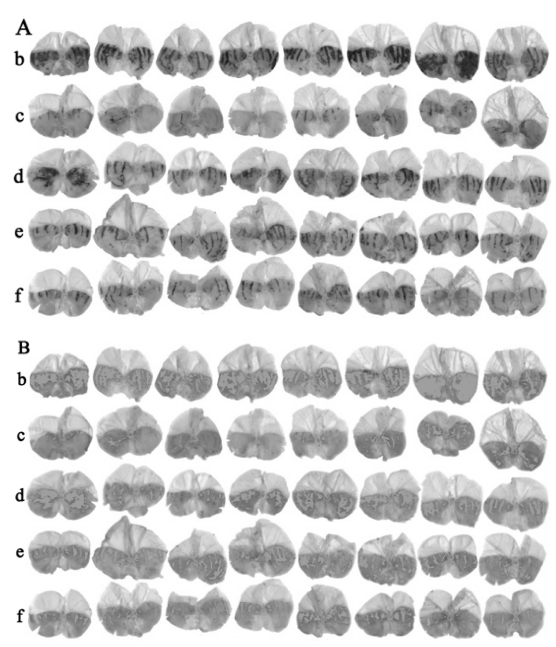


图 1 白及须根醇提物对大鼠胃组织的影响

注:A 图为扫描结果,B 图为 IPP 软件选定胃溃疡出血斑块图示;A、B 中 a-f 分别为模型组、阳性药物组、须根醇提物低剂量组、中剂量组、高剂量组。

2.2 对大鼠血清MDA、SOD、TNF-α、IL-1β、IL-10、PAF、VEGF的影响

2.2.1 SD大鼠血清中MDA与SOD值结果 见表1。

表1 各组大鼠血清中MDA及SOD含量 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清中MDA含量 (nmol/mL)	血清中SOD含量 (U/mL)
空白对照组	4.81±0.19	20.88±0.28
模型组	7.65±0.26 *	10.36±0.65 *
阳性药物组	6.20±0.22 [®]	19.20±0.71 [#]
醇提取物低剂量组	6.10±0.31 [®]	13.51±0.77 [#]
醇提取物中剂量组	6.15±0.28 [®]	16.03±1.00 [#]
醇提取物高剂量组	6.19±0.25 [®]	18.66±0.62 [#]

注:与正常组比较: *p<0.01;与模型组比较: [®]p<0.05, [#]p<0.01。

表2 各组大鼠血清中TNF-α、IL-1β及PAF的含量 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α (ng/mL)	IL-1β (ng/mL)	PAF (ng/mL)
空白对照组	0.91±0.09	0.66±0.08	0.55±0.05
模型组	1.73±0.04 *	1.26±0.09 *	0.87±0.07 *
阳性药物组	0.97±0.07 [#]	0.75±0.08 [#]	0.61±0.04 [#]
醇提取物低剂量组	1.55±0.09 [#]	1.16±0.10	0.69±0.05 [#]
醇提取物中剂量组	1.47±0.08 [#]	1.10±0.10 [#]	0.65±0.05 [#]
醇提取物高剂量组	1.26±0.07 [#]	0.92±0.08 [#]	0.64±0.05 [#]

注:与正常组比较: *p<0.01;与模型组比较: [®]p<0.05, [#]p<0.01。

2.2.3 SD大鼠血清中IL-10及VEGF的结果 见表3。

表3 各组大鼠血清中IL-10及VEGF的含量 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-10 (ng/mL)	VEGF (ng/mL)
空白对照组	0.42±0.05	0.61±0.06
模型组	0.51±0.04 *	0.69±0.06 *
阳性药物组	0.68±0.04 [#]	0.80±0.04 [#]
醇提取物低剂量组	0.55±0.05	0.72±0.06
醇提取物中剂量组	0.56±0.06 [®]	0.79±0.06 [#]
醇提取物高剂量组	0.64±0.06 [#]	0.83±0.05 [#]

注:与正常组比较: *p<0.01;与模型组比较: [®]p<0.05, [#]p<0.01。

由表3可见,与正常组相比,模型组大鼠血清IL-10和VEGF均有显著改变,二者分别经统计学处理存在极显著性差异, $p<0.01$ 。模型组与醇提取物低剂量组以外的各治疗组之间经统计学处理发现存在显著性差异, $p<0.05$ 。

综上所述,白及须根醇提取物能够有效预防胃溃疡的发生。

从表中可以看出,各造模组MDA与SOD值相比正常组均显著变化,表明乙醇造成了大鼠机体损伤;相比模型组各给药组均有显著降低,白及须根醇提取物低、中、高剂量组与阳性药物均有显著预防作用。醇提取物低剂量可显著提高SOD水平,但不如其高剂量组,呈现为剂量依赖性。

2.2.2 SD大鼠血清中TNF-α、IL-1β及PAF的结果 见表2。

由表2可见,与正常组相比,模型组大鼠血清TNF-α、IL-1β及PAF均有显著改变,二者经统计学处理存在极显著性差异, $p<0.01$ 。除了IL-1β检测中低剂量组与模型组比较无显著性差异以外,模型组与各治疗组之间经统计学处理发现存在极显著性差异, $p<0.01$ 。

3 讨论

有研究表明^[10-11],胃粘膜在化学物质、缺血等刺激下,可产生大量氧自由基导致粘膜损伤,氧自由基对胃粘膜损害可能为脂质过氧化损害与共价键结合性损害。自由基清除剂别嘌呤能促进溃疡愈合,明显降低溃疡的复发率^[12-13]。因此,提高体内氧自由基清除系统活性对治疗溃疡病具有重要意义。SOD是机体重要的抗氧化酶,可以清除自由基,MDA是脂质过氧化反应的中间产物,本实验观察了各药物对酒精性胃溃疡大鼠血清SOD活性、MDA含量的影响,结果表明,白及须根醇提取物与白及多糖高、低剂量都能显著升高酒精性胃溃疡大鼠血清SOD活性,降低MDA含量,说明白及对胃溃疡的治疗作用与提高体内氧自由基清除系统活性有关。同时发现白及须根醇提取物也具备一定的治疗作用。

药典明确记载白及传统炮制方式是要去其须根。但从本次药理实验结果可以发 (下转第89页)

达的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 413-416.

[24] 吴国琳, 普兴宏, 李天一. 养阴益气活血方对干燥综合征 NOD 小鼠血清及颌下腺 Th1/Th2 免疫平衡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1653-1657.

[25] 金桂兰, 孙丽霞, 汪悦. 增液布津汤对干燥综合征小鼠细胞因 INF- γ 、IL-6、IL-1 的影响[J]. 新中医, 2011, 43(3): 125-127.

[26] 吴晓丹, 孙丽英, 周洪伟, 等. 增液汤对干燥综合征模型小鼠颌下腺 Th1 样细胞因子 IL-2、IFN- γ 及 Th2 样细胞因子 IL-4、IL-6 的影响[J]. 中医药信息, 2008, 25(3): 34-36.

[27] 葛琳, 张华东, 姜泉, 等. 路氏滋燥汤对干燥综合征小鼠颌下腺细胞因 IFN- γ 、IL-10 的影响[J]. 新中医, 2011, 43(3): 125-127.

[28] 杨佳, 刘健, 张金山, 等. 新风胶囊对干燥综合征大 IL-10、TNF- α 、IL-17 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(3): 206-209.

[29] 孙丽英, 马育轩, 李微微. 增液汤对 SS 模型鼠颌下腺 Th1 样细胞因子的影响[J]. 中医药学报, 2010, 38(6): 42-44.

[30] 华红, 徐治鸿. 活血生津煎剂对免疫缺陷小鼠免疫功能调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24: 154-156.

[31] 周定华, 张前德, 魏睦新, 等. 丹地琼玉颗粒对干燥综合征小鼠唾液腺的影响[J]. 南京医科大学学报, 2005, 25(4): 266-267.

[32] 卞慧敏, 修媛娟, 刘征堂. 生津润燥颗粒对干燥综合征大鼠模型 TNF- α 和 Fas 的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2): 73-75.

(收稿日期: 2014-05-17 编辑: 巩振东)

(上接第 65 页)

现, 白及须根 95 % 乙醇提取聚酰胺吸附 95 % 乙醇洗脱样品, 即白及须根醇提物低剂量 (50 mg/kg)、中剂量 (200 mg/kg) 和高剂量 (200 mg/kg) 均能有效抑制急性胃溃疡造成的胃出血, 对胃溃疡具有一定的防治作用。其抗胃溃疡的机制是通过下调血清与溃疡表面炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 PAF 及上调血清与溃疡表面 IL-10 和 VEGF 从而发挥抗胃溃疡的作用。

综上所述, 白及须根醇提物对胃溃疡防治作用的发现, 在一定程度上体现了其具有一定的开发利用价值, 是对中药资源的一种有效补充, 为白及资源的充分开发与利用提供了科学依据, 为开发具有高效药理活性作用的新药提供研究基础。对白及抗胃溃疡作用细胞因子水平的深入研究为明确白及抗胃溃疡药理作用提供实验依据, 并为其他中药现代化研究及临床应用提供参考价值。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010 年版一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 95.

[2] 张永刚, 张竞. 白及粉治疗消化性溃疡两例例析[J]. 实用中医内科杂志, 2003, 17(1): 52-53.

[3] 方应权, 全哲山. 白及正丁醇萃取物对胃溃疡作用研究[J]. 江西中医药, 2008, 39(11): 46-48.

[4] 吴宗德, 刘汉君, 孙颖媛. 白及粉治疗消化性溃疡 60 例疗效观察[J]. 遵义医学院学报, 2004, 27(3): 255-256.

[5] 陶振宇, 兰克涛, 史春雷. 白及和三七联合奥美拉唑和

克拉霉素治疗胃溃疡 70 例疗效观察[J]. 河北医学, 2004, 10(3): 203-205.

[6] 刘莹, 崔炯莫, 李洪斌, 等. 白及超微粉对大鼠实验性胃溃疡的影响[J]. 中草药, 2008, 39(3): 397-400.

[7] 李伟平, 何良艳, 丁志山. 白及的应用及资源现状[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 158-159.

[8] Fusheng Jiang, Weiping Li, Yanfen Huang, Yitao Chen, Bo Jin, Nipi Chen, Zhishan Ding, Xinghong Ding. Antioxidant, Antityrosinase and Antitumor Activity Comparison: The potential Utilization of Fibrous Root part of Bletilla striata (Thunb.) Reichb. f. PLoS One, 2013, 8(2): 58004.

[9] Vandenplas Y. Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol, 2000, 6(1): 20-31.

[10] 张澄田. 消化性溃疡发病机理的某些新进展[J]. 实用中西医结合杂志, 1994, 7(1): 35.

[11] 施华秀, 任建林. 氧自由基与胃黏膜损伤[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(21): 2582-2585.

[12] Colpaert EE, Timmermans JP, Lefebvre RA. Immunohistochemical localization of the antioxidant enzymes biliverdin reductase and heme oxygenase-2 in human and pig gastric fundus. Free Radic Med 2002, (32): 630-637.

[13] Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA. The protective action of melatonin on indomethacin induced gastric and testicular oxidative stress in rats. Redox Rep 2001, (6): 173-177.

(收稿日期: 2014-08-29 编辑: 文颖娟)