

白藜芦醇预处理对束缚应激大鼠胃溃疡的保护作用

张红¹, 问慧娟^{2*}, 周雅静², 姜源涛¹

¹河北大学附属医院; ²河北大学基础医学院, 保定 071000

摘要: 采用水浸束缚应激(WRS)诱导大鼠急性胃粘膜损伤模型, 观察胃粘膜氧化应激指标和胃液 pH 值的变化, 探讨白藜芦醇对大鼠应激性胃溃疡的保护作用及机制。将 30 只 wistar 大鼠随机分为对照组, 应激组, 白藜芦醇低、中、高剂量组(30、60、120 mg/kg)。通过观察胃黏膜形态学改变, 测定胃液 pH 值、胃溃疡指数(UI)、胃黏膜组织 SOD 活性及 MDA 含量的改变, 研究不同剂量白藜芦醇对大鼠应激性胃溃疡的抑制作用及机制。结果显示白藜芦醇能明显减轻 WRS 大鼠胃黏膜的水肿、出血和溃疡面积, 明显降低 UI($P < 0.01$); 同时显著提高胃黏膜组织 SOD 的活性、胃液 pH($P < 0.01$) 和降低 MDA 水平($P < 0.01$), 各指标均以白藜芦醇中剂量组作用显著。本实验结果表明白藜芦醇具有较强的抗溃疡作用, 对束缚应激大鼠胃溃疡有明显保护作用, 其机制主要与减少自由基产生和提高抗氧化酶活性有关。

关键词: 白藜芦醇; 应激; 溃疡指数; SOD; MDA

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Protective Effects of Resveratrol Preconditioning on Stress Gastric Ulceration of Rats

ZHANG Hong¹, WEN Hui-juan^{2*}, ZHOU Ya-jing², JIANG Yuan-tao¹

¹Affiliated Hospital of Hebei University; ²Basic Medical College of Hebei University, Baoding 071000, China

Abstract: In this study, the protective effect of resveratrol on gastric mucosal damage induced by water-immersion restraint stress (WRS) in rats was investigated. 30 wistar rats were randomly divided into five experimental groups: control group, model group, low dose resveratrol (Res) group (30 mg/kg), middle dose Res group (60 mg/kg) and high dose Res group (120 mg/kg). Macroscopic gastric lesions were evaluated, the ulceration index and pH of gastric juice was measured, the content of malondialdehyde (MDA) and the activity of super oxide dismutase (SOD) in gastric mucosa were measured. The results showed that resveratrol significantly reduced the ulcer area induced by WRS and inhibited the Ulcer Index. Middle dose Res group showed the best result ($P < 0.01$); It significantly improved the SOD ($P < 0.01$) and pH of gastric juice, while reduced content of MDA ($P < 0.01$). The present study suggested that resveratrol was able to protect the gastric mucosa which may be mediated by improving the antioxidant live enzyme activity and restricting free radical production during stress.

Key words: resveratrol; stress; ulceration index; malondialdehyde; super oxide dismutase.

应激性胃溃疡是临床危重疾病的常见并发症, 在重症监护室(ICU)的发生率可高达 75% ~ 100%, 其发生机制尚未完全阐明, 但越来越多的研究显示, 氧化应激在应激胃黏膜损伤中发挥着重要作用, 调节或干扰氧化应激以及氧化与抗氧化之间的平衡是胃肠道粘膜细胞保护的一个重要方面。白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种天然抗氧化剂, 广泛存在于 21 科 31 属 72 种植物中, 其中葡萄、虎杖、花生、桑

葎等常见植物中含量较高。近年来的研究表明, Res 具有清除自由基、抗炎、抑制血小板聚集、舒张血管等多方面药理学作用, 目前主要应用于心血管保护、衰老、肿瘤预防等方面。Res 对应激引起的急性胃粘膜损伤的作用尚未见报道, 本实验以大鼠水浸-束缚应激(WRS)为模型, 探讨 Res 对应激性胃溃疡的保护作用, 并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

白藜芦醇(美国 Amresco 公司)。NOS 试剂盒、NO 试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测试试剂盒(均由南京

收稿日期: 2013-03-27 接受日期: 2013-09-11

基金项目: 河北省中医药类科研计划项目(2012134); 河北省科学技术研究与发展计划项目(11276103D-7); 河北省卫生厅重点科技研究计划项目(20100141)

* 通讯作者 Tel: 86-312-5994203; E-mail: 258159066@qq.com

建成生物工程研究所提供)。Stat-Fax-2100 酶标仪(美国 Awareness 公司);TDL-5-A 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A 型涡旋混匀器(上海沪西分析仪器厂);SHA-BA 型双功能水浴恒温振荡器(金坛市杰瑞尔电器有限公司)。

1.2 模型制作与分组

Wistar 大鼠(河北医科大学实验动物中心提供)30 只,雌雄各半,体重 220~300 g,随机分为正常对照组(NG)、应激组(MG)、白藜芦醇低剂量组(LDG)、中剂量组(MDG)和高剂量组(HDG)。白藜芦醇各处理组以白藜芦醇分别按 30、60、120 mg/kg 灌胃 3 d,NG 组和 MG 组灌服同等容量的生理盐水。末次给药后,参照 Cui 等人^[1]的方法建立 WRS 模型,8 h 后将动物用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,剖腹,游离出胃。

1.3 胃酸测定

抽取胃液,pH 计测定胃液 pH 值。

1.4 胃溃疡指数测定

结扎贲门、幽门端,用 10 mL 生理盐水充灌,置于 0.5% 福尔马林溶液中固定 5 min,沿胃大弯剪开,漂洗,用滤纸吸干水分,展平,观察溃疡形成情况,按改良 Guth 标准^[1]计算溃疡指数:病变的最大径 <1 mm 为 1 分;1~2 mm 为 2 分;2~3 mm 为 3 分;3~4 mm 为 4 分;将 >4 mm 者分成若干段,每段

按上法计分,若病灶宽于 2 mm,其长度乘以 2。全胃各病灶评分之和作为溃疡指数(Ulcer Index,UI)。

1.5 胃组织 MDA、SOD 活性测定

留取溃疡明显处的胃粘膜组织约 0.3 g,加 9 倍的生理盐水,制备成 10% 的组织匀浆,4 ℃ 3000 rpm 离心 10 min,取上清液待测。各取 50 μL 胃组织匀浆上清液,按试剂盒说明书进行操作。组织蛋白含量用考马斯亮兰法测定。

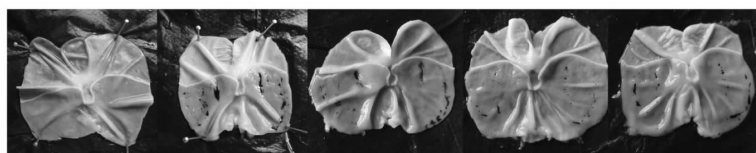
1.6 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graphpad prism 软件进行统计学分析,两组样本比较采用 *t* 检验,多组样本比较采用 one-way ANOVA 分析,组间采用 Newman-Student-Keuls 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 形态学观察

正常大鼠胃黏膜表面光滑,未见水肿及出血点;WRS 各组大鼠胃腔内含大量咖啡样物质,冲洗后可见胃粘膜表面部分脱落,可见广泛分布、呈条索状或点状的深褐色溃疡面和出血点,溃疡周围呈弥漫性水肿,以应激组最为明显;Res 各组胃黏膜水肿、溃疡面及出血点均有不同程度减轻,以中剂量组作用显著。结果见图 1。



对照组 应激组 Res 低剂量组 Res 中剂量组 Res 高剂量组

图 1 各组大鼠胃体部的形态学图片

Fig. 1 Gastric morphologic images of different groups

2.2 胃溃疡指数(UI)的变化

与对照组比较,应激组 UI 显著升高($P < 0.01$);与应激组比较,Res 各组 UI 显著降低(均 $P < 0.01$),以中剂量组作用显著,其中低、高剂量组

与中剂量组比具均有显著差异(均 $P < 0.01$),说明 Res 可抑制胃溃疡产生,并具有一定的剂量依赖性;对照组 UI 为 0,见表 1。

表 1 白藜芦醇对 WRS 模型胃溃疡指数、胃液 pH、胃组织 SOD、MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of resveratrol on Ulceration Index, pH of gastric juice, SOD and MDA($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	UI Ulceration index	胃液 pH Gastric juice pH	MDA(nmol/mg prot) Super oxide dismutase	SOD(U/mg prot) Malondialdehyde
NG	0	3.71 ± 0.58	36.15 ± 4.31	28.71 ± 2.77
MG	50.25 ± 3.58 **	2.17 ± 0.34 **	57.49 ± 6.14 **	16.19 ± 1.52 **

LDG	37.92 ± 5.96 ^{##△△}	2.87 ± 0.61 [#]	50.63 ± 5.25 ^{##△}	19.84 ± 2.36 ^{##△△}
MDG	26.35 ± 6.12 ^{##}	3.12 ± 0.26 ^{##}	42.12 ± 4.01 ^{##}	25.22 ± 3.43 ^{##}
HDC	36.71 ± 3.75 ^{##△△}	2.96 ± 0.45 [#]	48.26 ± 4.16 ^{##△}	24.14 ± 3.65 ^{##}

注:与对照组比较, * * $P < 0.01$; 与应激组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与中剂量组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * * $P < 0.01$; Compare with model, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compare with middle dose Res group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.

2.3 胃液 pH 的变化

应激组大鼠胃液 pH 明显低于对照组 ($P < 0.01$), Res 各处理组均使 pH 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但各剂量组之间没有显著差异, 见表 1。

2.4 胃粘膜组织 SOD、MDA 活性的变化

应激组大鼠 SOD 活性明显降低, MDA 含量明显升高, 与对照组相比改变均有显著性差异 (均 $P < 0.01$); Res 各组使这些指标均发生了相反变化 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以中剂量组作用显著; 其中低剂量组与中剂量组比有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

3 讨论

氧自由基通过脂质过氧化反应引起细胞膜、细胞器膜破坏, 而且可与蛋白质巯基或色氨酸残基反应, 导致蛋白质功能或酶活性丧失, 引起细胞广泛的损伤。超氧阴离子 (O_2^-) 是生物体内最先形成、最主要的氧自由基, 可被体内抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD) 及时清除。氧化和抗氧化平衡失调是许多疾病发生、发展的一种最基本、最普遍的危险因素。应激性胃溃疡的发病机制尚未完全阐明, 目前普遍认为在应激性胃粘膜损伤中氧自由基是一个早期的、独立的致损伤因素而备受关注^[2]。本实验结果也显示, 应激刺激导致 MDA 含量明显升高、SOD 活性显著降低。因此胃粘膜氧自由基产生和清除失衡是造成胃粘膜的损伤重要机制之一。

大量的研究发现许多中草药表现出了很好的抗溃疡作用, 其突出机制是他们的抗氧化活性或清除活性氧簇 (ROS) 的能力。Res 是一种天然多酚类物质, 具有很强的抗氧化性。Roghani 等发现 1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 能有效抑制细胞内外氧自由基的产生^[3]; Leonard 等证实 Res 是一个有效的羟基、超氧化物和金属诱导基团的清除剂, 并对活性氧引起的细胞膜脂质过氧化和 DNA 损伤具有保护作用^[4]; Holthoff 也发现 Res 是一种功能性过氧亚硝基阴离子清除剂^[5]。本实验中, Res 预处理后明显减轻了 WRS 大鼠胃粘膜的水肿、出血和溃疡面积, 溃疡指数也显著降低, 显示出 Res 对应激性胃溃疡有明确

的保护作用; Res 使胃粘膜组织 SOD 的活性显著升高, MDA 含量降低, 提示 Res 通过减少氧自由基产生和增加其清除而抑制胃粘膜损伤, 发挥了其抗氧化特性。实验中还发现 Res 的抗溃疡作用以中剂量组显著, 低剂量组也显示出改善胃溃疡的药效, 但高剂量组作用反而减弱, 可能与剂量过大而增加药物毒性作用有关, Dey 报道白藜芦醇在较高剂量加重溃疡^[6]。

胃酸在应激性溃疡形成中的作用长期以来一直存在争议, 现代普遍认为胃酸不是应激性溃疡发病的主要因素, 但是胃酸的存在会加重胃粘膜损伤, 促进溃疡发生。本研究显示束缚应激引起胃液 pH 明显降低, Res 使胃液 pH 升高, 在一定程度上防止了胃溃疡的发生或加重。Res 提高胃液 pH 的机制目前尚不清楚, 贾一韬发现在束缚应激早期即有 NF- κ B 信号通路的活化^[7], IL- β 、IL-6 等细胞因子释放增加, 强烈刺激下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴 (HPA) 轴, 使胃酸和胃蛋白酶分泌增多^[8,9], Res 可激活 SIRT-1, 抑制 NF- κ 信号通路, 下调 TNF- α 、IL- β 、IL-6 表达, 因而抑制胃酸分泌^[10]。有研究发现 NO 是胃酸分泌的内源性抑制剂^[11], Res 可提高 eNOS 活性, 增加 NO 合成^[12], 因而能抑制胃酸分泌, 提高胃液 pH。其具体机制有待进一步研究。

中药的药物作用通常被认为是更安全的传统疗法的替代, Res 通过其强抗氧化活性及抑制胃酸分泌而预防应激性胃粘膜的损伤。因此, Res 有望成为一种新型黏膜保护剂。

参考文献

- 1 Cui YY (崔玉英), Tang CS (唐朝枢), Geng B (耿彬). Res-treatment stress down-regulates L-Arg/NOS/NO pathway of platelet and aortic intima in rats. *J Peking Univ, Health Sci* (北京大学学报, 医学版), 2006, 38: 231-235.
- 2 Shian WM, Sasaki I, Kamiyama Y, et al. The role of lipid peroxidation on gastric mucosal lesions induced by water-immersion-restraint stress in rats. *Surg Today*, 2000, 30: 49-53.
- 3 Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Mechanisms underlying vascular effect of chronic resveratrol in streptozotocin-diabetic rats. *Phytother Res*, 2010, 24 (Suppl 2): 148-154.

(下转第 299 页)