

# 黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的影响

李燕舞, 宋宁, 王汝俊

李燕舞, 王汝俊, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405

宋宁, 河南中医学科学院 河南省郑州市 450008

作者贡献分布: 此课题由李燕舞及王汝俊设计; 研究过程中由李燕舞与宋宁操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李燕舞提供; 数据分析由李燕舞与宋宁完成; 本论文写作由李燕舞完成。

广州中医药大学创新基金资助项目, No. 200607F31

通讯作者: 李燕舞, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所. lyw\_7614@126.com

电话: 020-36585555

收稿日期: 2008-07-30 修回日期: 2008-09-04

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-18

## Influence of astragaloside on gastric mucosal oxygen free radicals and melatonin receptors of rats with stress ulcer

Yan-Wu Li, Ning Song, Ru-Jun Wang

Yan-Wu Li, Ru-Jun Wang, the Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Ning Song, Henan University of Traditional Chinese Medicine Zhengzhou 450008, Henan Province, China

Supported by: the Innovation Foundation of Guangzhou University of Chinese Medicine, No. 200607F31

Correspondence to: Yan-Wu Li, the Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. lyw\_7614@126.com

Received: 2008-07-30 Revised: 2008-09-04

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of astragaloside (AST) on gene expression of melatonin receptor and oxygen free radical in gastric mucosa of rat with stress ulcer.

**METHODS:** A total of 48 experimental animals were equally divided into 4 groups: the control group, the model group, the AST group and the ranitidine group. The stress ulcer model was established using water immersion and restraint. The SOD activity, the MDA contents were determined using colorimetry, and the expression of melatonin receptors 1 and 2 were detected in gastric mucosa using RT-PCR.

**RESULTS:** Compared with the control group, the

model group showed increased ulcer index and elevated MDA contents, decreased SOD activity and down-regulated mRNA expression of melatonin receptors in damaged gastric mucosa. After administration of AST, the gastric mucosal ulcer index decreased significantly ( $6.75 \pm 4.10$  vs  $16.83 \pm 4.96$ ,  $P < 0.01$ ) and MDA contents were relieved obviously ( $0.45 \pm 0.07$  vs  $0.79 \pm 0.36$ ,  $P < 0.05$ ). The SOD activity ( $110.62 \pm 26.42$  vs  $71.74 \pm 22.20$ ,  $P < 0.05$ ) and the expression of melatonin receptor1, 2 mRNA were significantly elevated ( $0.86 \pm 0.12$  vs  $0.54 \pm 0.05$ ,  $0.79 \pm 0.14$  vs  $0.50 \pm 0.10$ , both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** AST could prevent the gastric mucosal damage of rats with stress ulcer. And the mechanism of the gastric mucosal protection is perhaps concerned with regulating melatonin receptor and lessening the injury of oxygen free radicals.

**Key Words:** Astragaloside; Oxygen free radical; Melatonin receptor; Stress ulcer

Li YW, Song N, Wang RJ. Influence of astragaloside on gastric mucosal oxygen free radicals and melatonin receptors of rats with stress ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3321-3323

## 摘要

**目的:** 探讨黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜褪黑素受体基因表达及氧自由基变化的影响。

**方法:** SD大鼠48只分为4组, 即正常对照组, 模型组, 黄芪总苷组和雷尼替丁组, 每组12只。采用水浸-束缚应激模型, 观察胃黏膜损伤指数, 比色法检测胃黏膜SOD活性、MDA含量, RT-PCR法测定褪黑素受体1、2亚型mRNA表达变化。

**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜损伤指数明显增高, MDA含量增高, SOD活性下降, 褪黑素受体1、2基因表达降低, 黄芪总苷预防给药后可明显降低应激大鼠胃黏膜损伤指数 ( $6.75 \pm 4.10$  vs  $16.83 \pm 4.96$ ,  $P < 0.01$ ) 和MDA含量 ( $0.45 \pm 0.07$  vs  $0.79 \pm 0.36$ ,  $P < 0.05$ ), 升高SOD活性 ( $110.62 \pm 26.42$  vs  $71.74 \pm 22.20$ ,  $P < 0.05$ ) 和褪黑素受体1、2基因表达 ( $0.86 \pm 0.12$  vs  $0.54$

## ■背景资料

国内外文献报道, 应用褪黑素(MT)对应激性胃黏膜损伤有保护作用, 中药黄芪及其有效成分黄芪总苷广泛应用于胃黏膜损伤相关疾病, 其作用机制是否与通过调节内源性MT及其受体相关, 尚未定论。

## ■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

## ■研究前沿

褪黑素对胃肠道疾病的影响和在胃肠道中的作用被逐步认识,其在急性胃黏膜损害疾病中发挥的保护作用受到重视,中药对机体内源性MT调节的研究有助于新型抗胃黏膜损伤中药制剂的研发。

$\pm 0.05, 0.79 \pm 0.14$  vs  $0.50 \pm 0.10$ , 均 $P < 0.01$ ).

**结论:** 黄芪总苷对水浸-束缚应激大鼠胃黏膜损伤有保护作用,其保护机制可能与调节胃黏膜褪黑素受体,并参与抗氧自由基损伤有关。

**关键词:** 黄芪总苷; 氧自由基; 褪黑素受体; 应激性溃疡

李燕舞, 宋宁, 王汝俊. 黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3321-3323

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3321.asp>

## 0 引言

褪黑素(melatonin, MT)是一种神经内分泌激素,具有广泛的生理效应,并且参与机体许多疾病或损伤的保护反应. MT可直接清除和抑制氧自由基产生,还能增强内源性抗氧化酶的作用. 近年来, MT在胃肠道中的保护作用日益受到重视,大量研究表明: 外源性应用MT对各种实验性胃损伤有保护作用<sup>[1-4]</sup>. 黄芪是益气健脾中药的代表,具有益气健脾、固表生肌的作用,广泛应用于胃肠道疾病,具有胃黏膜保护及抗氧化作用<sup>[5]</sup>. 本文观察了黄芪总苷对应激大鼠急性胃黏膜损伤的保护作用,并从胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的变化探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SD大鼠48只, ♂, SPF级, 180-220 g, 购自广东省医学实验动物中心, 许可证号SCXK(粤)2003-0002. 黄芪总苷购自西安鸿生生物技术有限公司, 批号060614. TaKaRa RNAiso Reagent及合成引物购自宝生物工程有限公司, 逆转录试剂盒(Fermentas)购自晶美生物工程公司; 2×Taq Platinum PCR MasterMix(Tiagen)购自广州合达生物科技有限公司; SOD、MDA检测试剂盒购自南京建成生物有限公司. 6131紫外/可见光分光光度计(eppendorf biophotometer); Kodak 1D Image成像系统; PTC-100 Peltier Thermal Cycler(MJ Research).

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型及分组:** 实验动物分为4组, 每组12只, 即正常对照组, 模型组, 黄芪总苷组和雷尼替丁组. 各组动物一半用于形态学检查, 其他用于胃黏膜MDA、SOD及MT受体基因检测. 黄芪总苷组预防性灌胃给药(20 mg/kg)3 d, 第3天末次给药后(包括阳性药雷尼替丁12.5 mg/kg), 采用水浸-束缚胃黏膜损伤模型<sup>[6-8]</sup>. 大鼠禁食24

h后, 除正常对照组外, 将大鼠装入应激笼内, 垂直浸入 $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中, 水面平胸骨剑突. 持续时间6 h, 处死动物, 取胃观察胃黏膜损伤的程度和形态(Guth法计算损伤分数). 冰冷生理盐水冲洗胃并迅速刮取胃黏膜,  $-80^\circ\text{C}$ 保存备用.

**1.2.2 化学比色法检测大鼠胃黏膜SOD、MDA:** 胃黏膜按重量加入生理盐水进行匀浆, 离心取上清, 按试剂盒步骤检测SOD、MDA含量.

**1.2.3 RT-PCR测定胃黏膜MT受体1、2 mRNA表达:** 胃黏膜总RNA提取参照RNAiso Reagent提取说明书进行. 提取产物经紫外分光光度计定量后应用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit进行逆转录. 逆转录产物进行PCR反应, 引物由宝生物工程有限公司合成, MT受体1上游: 5'-GTG CTA CGT GTT CCT GAT ATG G-3', 下游: 5'-GGA TCT GAG GCC ACA ATA AGA C-3', 360 bp; MT受体2上游: 5'-ATC TGT CAC AGT GCG ACC TAC C-3', 下游: 5'-TTC TCT CAG CCT TTG CCT TC-3', 292 bp; GAPDH上游: 5'-CTA CCC ACG GCA AGT TCA AT-3', 下游: 5'-ACT GTG GTC ATG AGC CCT TC-3', 382 bp. MT受体1及MT受体2反应条件:  $94^\circ\text{C}$  1 min变性,  $55^\circ\text{C}$  1 min退火,  $72^\circ\text{C}$  2 min延伸, 40个循环. GAPDH反应条件:  $94^\circ\text{C}$  30 s变性,  $55^\circ\text{C}$  45 s退火,  $72^\circ\text{C}$  1 min延伸, 35个循环. PCR产物进行琼脂糖电泳, 经Kodak 1D Image成像系统分析, 以目的基因(MT受体1、2)与内参(GAPDH)光密度比值表示MT受体mRNA的相对表达量.

**统计学处理** 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用SPSS11.0软件进行组间比较,  $t$ 检验分析结果.

## 2 结果

**2.1 胃黏膜损伤指数观察** 正常大鼠胃黏膜色泽红润, 未见损伤性改变. 模型组大鼠胃黏膜充血明显, 可见有散在点状及条索状出血性损伤, 胃腔内容物呈褐色. 经黄芪总苷预防治疗后, 胃黏膜损伤明显减轻, 胃黏膜损伤指数降低, 与模型组比较, 雷尼替丁组和黄芪总苷组损伤指数有显著统计学差异( $3.17 \pm 2.32, 6.75 \pm 4.10$  vs  $16.83 \pm 4.96, P < 0.01$ ).

**2.2 胃黏膜SOD、MDA含量变化** 与正常对照组比较水浸-束缚应激模型大鼠胃黏膜SOD活力明显降低, MDA含量显著增高, 经黄芪总苷预防给药后SOD活力增高, 而MDA含量降低(表1).

**2.3 胃黏膜褪黑素受体1、2(MT1、MT2)基因表达** 大鼠胃黏膜有MT受体1、2基因表达; 水浸-束缚应激模型大鼠胃黏膜MT受体1、2表达较

## ■应用要点

黄芪总苷具有广泛的药理效应, 本研究发现其对应激胃黏膜损伤具有保护作用, 可调节胃黏膜氧自由基及褪黑素受体. 本研究对探讨中药的作用靶标及新型抗应激性胃黏膜损伤中药制剂的开发具有一定的意义。

表 1 胃黏膜SOD、MDA含量变化 ( $n = 6$ )

分组	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
正常对照组	201.99 ± 65.37	0.44 ± 0.05
模型对照组	71.74 ± 22.20 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.36 <sup>a</sup>
黄芪总苷组	110.62 ± 26.42 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.07 <sup>c</sup>
雷尼替丁组	128.99 ± 28.51 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.08 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 模型组.

表 2 胃黏膜MT受体1、2 mRNA相对表达量的变化 ( $n = 6$ )

分组	MT1/GAPDH	MT2/GAPDH
正常对照组	0.56 ± 0.10	0.52 ± 0.16
模型对照组	0.54 ± 0.05	0.50 ± 0.10
黄芪总苷组	0.86 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.14 <sup>a</sup>
雷尼替丁组	0.73 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.11 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

正常对照组略有降低, 而经黄芪总苷预防给药后, 应激大鼠胃黏膜MT受体1、2表达均有显著增高(表2).

### 3 讨论

应激性溃疡是各种应激情况下引起的以胃黏膜充血、水肿、糜烂和出血等为主的急性胃黏膜病变. 已有研究表明, 氧自由基的产生在应激性溃疡的病理过程中起重要作用<sup>[9]</sup>. SOD及MDA是目前公认的较好反映体内自由基损伤的指标. 本研究发现, 水浸-束缚应激大鼠胃黏膜可见点状及条索状溃疡出现, 胃黏膜损伤指数明显增高, 同时SOD活性下降, MDA含量上升, 可见胃黏膜氧自由基产生增多和抗氧化酶的减少可能是胃黏膜损伤的重要因素. 而黄芪总苷预防给药后, 应激大鼠胃黏膜损伤明显减轻, SOD活性明显增高, MDA含量下降, 表明黄芪总苷对胃黏膜的保护作用可能与抗氧化自由基损伤有关.

褪黑素是一种作用很强的内源性抗氧化剂, 除了能直接清除和抑制氧自由基产生外, 还能增强内源性抗氧化酶的作用<sup>[10-11]</sup>. 研究表明, 外源性褪黑素对应激性胃黏膜损伤有保护作用, 其机制可能与增加胃黏膜血流、抗脂质过氧化作用及抑制胃酸分泌有关<sup>[12-15]</sup>. 研究证明, 褪黑素受体为膜受体, 特异性与褪黑素结合产生生物效应. 褪黑素受体主要存在于中枢的下丘脑、垂体及外周的胸腺、胃肠道、肾等部位, 因此褪黑素对机体的调节是多层次的综合影响.

本研究通过观察胃黏膜褪黑素受体1、2亚型的变化, 分析黄芪总苷对应激状态下内源性褪黑素的影响及其机制, 结果发现: 应激状态下大鼠胃黏膜褪黑素受体1、2均有所下调, 推测可能是应激引起机体褪黑素代偿性增高, 从而抑制了其受体的表达, 但强烈的损伤因素(应激)超过了保护因素(褪黑素分泌), 导致胃黏膜损伤发生, 预防性给予黄芪总苷后, 褪黑素受体1、2表达均显著上调, 可能是黄芪总苷促进了褪黑素分泌或加强其与受体结合, 继而参与了抗氧化自由基损伤的过程.

### 4 参考文献

- Kato K, Murai I, Asai S, Komuro S, Matsuno Y, Matsukawa Y, Kurosaka H, Iwasaki A, Ishikawa K, Arakawa Y. Central effect of melatonin against stress-induced gastric ulcers in rats. *Neuroreport* 1997; 8: 2305-2309
- Cabeza J, Motilva V, Martín MJ, de la Lastra CA. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sci* 2001; 68: 1405-1415
- Bilici D, Süleyman H, Banoğlu ZN, Kiziltunç A, Avci B, Ciftcioglu A, Bilici S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 856-861
- Bandyopadhyay D, Bandyopadhyay A, Das PK, Reiter RJ. Melatonin protects against gastric ulceration and increases the efficacy of ranitidine and omeprazole in reducing gastric damage. *J Pineal Res* 2002; 33: 1-7
- 李维祖, 李卫平, 尹艳艳. 黄芪总苷及黄芪甲苷对糖皮质激素诱导衰老大鼠氧自由基代谢的影响. *中国中药杂志* 2007; 32: 2539-2542
- 沈德凯, 章复清, 韦多, 刘冰怀. 大鼠应激性胃溃疡的形成与中枢神经系统、胃和血浆中单胺类神经递质的关系. *中国危重病急救医学* 1997; 9: 394-399
- 笄红远. 应激性胃溃疡实验研究及中药防治作用研究进展. *中国临床药理学杂志* 2005; 21: 467-469
- 张玉玉, 祝文兴, 孙一耕, 艾洪滨. 大鼠束缚-浸水应激模型体温降低与应激性胃溃疡的关系. *生物医学工程研究* 2007; 26: 282-284
- Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 39-50
- 钟历勇. 松果体腺、褪黑素与抗应激作用. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2003; 23: 522-525
- 吴建胜, 吴金明, 陈民新. 褪黑素与急性胃粘膜病变. *国外医学·消化系疾病分册* 2004; 24: 348-351
- 吴建胜, 吴金明, 黄智铭, 王旦, 黄庆科, 陈向荣, 林向飞, 陈民新, 韩清锡. 应激大鼠胃黏膜氧化应激指标受褪黑素影响的研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2005; 14: 629-630
- 李开学, 邓联民, 陈碧玲, 刘新民. 褪黑素对大鼠应激性溃疡保护作用研究. *中国误诊学杂志* 2005; 5: 1219-1220
- 吴建胜, 吴金明, 黄庆科, 王旦, 林向飞, 黄智铭, 陈向荣, 陈民新, 韩清锡. 褪黑素对大鼠应激性胃黏膜损害的保护作用. *中华内科杂志* 2005; 44: 50-51
- 黄碧兰, 王秋桂, 余良主, 丁洁琼, 唐琼. 褪黑素对大鼠应激性胃粘膜损伤的保护作用及其机理. *咸宁学院学报(医学版)* 2006; 20: 288-290

### ■同行评价

本研究设计合理, 数据可信, 结论可靠, 具有一定的可读性.