

文章编号:1001-6880(2016)11-1699-08

铁皮石斛抗阿司匹林诱导急性胃黏膜损伤活性组分筛选及作用研究

杨传玉^{1,2}, 刘帆^{1,2}, 吴耽^{1,2}, 王爱民^{1,2*}, 刘亭^{1,3}¹贵州医科大学药学院; ²民族药与中药开发应用教育部工程研究中心; ³贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004

摘要:筛选铁皮石斛抗阿司匹林诱导急性胃黏膜损伤的活性组分,并探讨其抗胃黏膜损伤的作用。体外采用阿司匹林诱导人胃黏膜上皮 GES-1 细胞氧化应激损伤,铁皮石斛各组分预保护 GES-1 细胞 24 h,MTS 法检测细胞存活率,并通过比色法测定细胞上清液中乳酸脱氢酶 LDH 含量;体内采用阿司匹林建立 SD 大鼠急性胃黏膜损伤模型,灌胃给予铁皮石斛各组分,连续给药 7 d 后以溃疡指数评价铁皮石斛各组分抗阿司匹林致胃黏膜损伤作用,并通过测定胃液量、总酸度、胃蛋白酶活力、血清中一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)以及胃组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、前列腺素 E₂(PGE₂),分析其可能的作用机制。结果表明,与模型组比较,铁皮石斛多糖组受损细胞活力显著升高,细胞上清液 LDH 含量显著降低,其它各组分细胞存活率及细胞上清液 LDH 含量与模型组无显著性差异;与模型组比较,铁皮石斛多糖组分显著降低胃溃疡模型大鼠的胃溃疡指数,抑制胃液分泌和胃酸含量及降低胃蛋白酶活性;与模型组比较,铁皮石斛多糖各组大鼠血清 NO 明显升高,TNF- α 、IL-6 显著降低,铁皮石斛多糖各组大鼠胃组织 MDA 水平明显降低,SOD、PGE₂ 水平显著升高。铁皮石斛多糖有显著的抗阿司匹林诱导胃黏膜损伤作用。

关键词:铁皮石斛; GES-1 细胞; 阿司匹林; 胃黏膜损伤; 多糖

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.003

Screening of Active Sites in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo on Aspirin-induced Gastric Mucosal Injury in Rats and Investigating Mechanism

YANG Chuan-yu^{1,2}, LIU Fan^{1,2}, WU Dan^{1,2}, WANG Ai-min^{1,2*}, LIU Ting^{1,3}

¹School of Pharmacy, Guizhou Medical University; ²Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education; ³Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guiyang 550004, China

Abstract: To screen active sites and investigate the protective effect of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo on aspirin-induced gastric mucosal injury in rats as well as the possible mechanism. Human gastric epithelial cell line GES-1 was cultured *in vitro*, and pretreated with different concentrations of *D. officinale* extracts before aspirin treatment; MTS assay was used to detect the cell viability. The content of LDH was also determined by the LDH kit. Gastric mucosal injury models induced by aspirin in SD rats was established by intragastric administration of different doses of *D. officinale* for seven days, and ulcer area was assessed to analyze the effect of *D. officinale* on gastric mucosal injury induced by aspirin in rats. The content of gastric secretion, gastric acid, pepsin, NO, TNF- α , IL-6, SOD, MDA and PGE₂ were measured to analyze the mechanism. The results showed that the cell viability of polysaccharide fraction of *D. officinale* increased significantly. The content of LDH significantly decreased, and other group was not significantly different. Compared with aspirin-treated group, the content of gastric secretion, gastric acid, pepsin and gastric ulcer area of polysaccharide group rats was significantly reduced; Compared with aspirin-treated group, NO, SOD and PGE₂ of polysaccharide group rats was significantly increased, while the content of TNF- α , IL-6, MDA were significantly decreased. In conclusion, *D. officinale* polysaccharide had a significant anti-acute gastric ulcer effects induced by aspirin.

收稿日期:2016-08-01 接受日期:2016-09-29

基金项目:贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合 SY 字[2014]3032-2 号);民族药与中药开发应用产学研基地建设(黔科合 KY 字[2013]122);民族药化学成分及活性研究(黔科合人字(2015)11 号)

* 通讯作者 Tel:86-851-86908468; E-mail:gywam100@163.com

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; GES-1 cells; aspirin; gastric ulcer; polysaccharide

铁皮石斛为兰科石斛属植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)的干燥茎,为我国

传统名贵药材,有味甘、质重、黏性大等特点,享有“中华九大仙草之首”的美誉^[1];《神农本草经》将其列为上品,有滋阴清热、益胃生津,润肺止咳等功效^[2]。目前广泛被人们所接受,作为一种常见的保健品服用,其药理研究表明,铁皮石斛具有明显的抗氧化、抗肿瘤、降低血糖以及提高免疫力等作用,在治疗恶性肿瘤、糖尿病、白内障、关节炎等疾病方面具有广泛的药理活性^[3]。据国内早期研究报道,铁皮石斛提取物对冷水浸泡、非甾体抗炎药诱导的小鼠胃溃疡以及乙醇诱导的 SD 大鼠急性胃损伤有较好预防保护作用^[4,5],但活性组分不明确,因此本实验体外建立阿司匹林诱导胃黏膜上皮 GES-1 细胞氧化应激损伤模型和体内建立阿司匹林致大鼠实验性胃黏膜急性损伤模型,共同筛选铁皮石斛抗急性胃黏膜损伤的活性组分,以及探讨其抗胃黏膜损伤的作用及可能机制,为今后进一步开发铁皮石斛提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物

GES-1 细胞来源于人永生化胃黏膜上皮细胞(GES-1),购于上海中科院细胞库;SPF 级 SD 大鼠[雌雄各半 180~220 g,SCXK(湘)2014-0011],购于长沙市天勤生物技术有限公司。

1.2 药品及试剂

优质胎牛血清(澳洲 Gibco),胰蛋白酶(美国 Hyclon),磷酸盐缓冲液(美国 HycAlon),DMEM-H(澳洲 Gibco),LDH 试剂盒、SOD 试剂盒、MDA 试剂盒、胃蛋白酶试剂盒,TNF- α ELISH 试剂盒、IL-6 ELISH 试剂盒、PGE₂ ELISH 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所,NO 试剂盒(碧云天生物技术有限公司),MTS 试剂盒(美国 Promega),二甲基亚砜(科秘欧化学试剂有限公司);阿司匹林(贵州圣都药业有限公司,A1507002),奥美拉唑肠溶胶囊(沈阳奥华制药有限公司,150101),铁皮石斛药材购于贵州罗甸铁皮石斛种植基地(批号:20151109,贵州医科大学药教研室龙庆德副教授鉴定)。

1.3 仪器与设备

CO₂ 培养箱(美国 Thermo),酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司),倒置显微镜(日本尼康公司),METTLER AE240 十万分之一电子天平(梅特勒-脱利多仪器上海有限公司),DZF-6050 真空干燥箱(上海博讯有限公司医疗设备厂),超纯水机(四

川沃特尔科技发展有限公司),紫外分光光度计 UV-2401PC(日本岛津),游标卡尺。

1.4 实验方法

1.4.1 供试药物的制备

铁皮石斛粉末(3 号筛),加 10 倍量 85% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,得滤液;将滤液浓缩后,得非多糖组分 Fr. A,提取率为 13.06%,主要成分为木脂素类、酚酸类、生物碱等;药渣挥干乙醇,加入 30 倍量水,95 °C 浸泡提取 3 次,每次 2 h,滤过,将滤液浓缩至 1/3 体积,加入无水乙醇至 80%,沉淀多糖,经 Sevag 法(氯仿:正丁醇 5:1)除去蛋白质得多糖组分 Fr. B 和醇溶液组分 Fr. C,其提取率分别为 15.21%、4.32%。组分 Fr. B 分子量分布范围 50~1000 KD^[6],经衍生化后,其单糖组成为葡萄糖、甘露糖、半乳糖、半乳糖醛酸等;醇溶液组分 Fr. C 主要为小分子糖等。

1.4.2 GES-1 细胞分组及给药

人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 细胞,以含 10% 胎牛血清 DMEM + 1 培养基为培养液,于 37 °C、5% CO₂、相对湿度 90% 培养箱中培养。选取对数期细胞,将细胞分为空白组、阿司匹林模型组(18.50 μmol/mL)、奥美拉唑阳性组(20 μg/mL)、Fr. A 组(50、100、300 μg/mL)、Fr. B 组(50、100、300 μg/mL)、Fr. C 组(50、100、300 μg/mL),复制阿司匹林损伤 GES-1 细胞氧化应激损伤模型^[7,8],铁皮石斛各组分联合阿司匹林处理 GES-1 细胞作用 24 h。细胞增殖与毒性试剂盒(MTS)检测细胞存活率,LDH 试剂盒测定各组细胞上清液 LDH 含量,复孔 5 次。

1.4.3 动物分组与给药

实验动物随机分为 12 组,每组 8 只,雌雄各半。阿司匹林原药与铁皮石斛各组分由 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制。分别灌胃铁皮石斛 Fr. A 低、中、高剂量,Fr. B 组分低、中、高 3 个剂量,Fr. C 组分低、中、高剂量(临床生药剂量为 6、12、24 g/d),奥美拉唑混悬液 0.018 g/kg,阿司匹林模型组、空白组灌胃给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,连续给药 7 d,每天给药 1 次。末次给药前禁食不禁水 24 h,末次给药 1 h 后,灌胃给予阿司匹林 0.4 g/kg^[9,10]。

1.4.5 各组大鼠胃液量、胃液总酸度、胃蛋白酶活力的测定

5 h 后,麻醉大鼠,结扎贲门和幽门,取胃,沿胃

大弯处剪开,收集胃内容物,分离上清液,测量胃液量;取0.5 mL上清液,用0.01N NaOH滴定,酚酞为指示剂测定胃液中总酸度;按照试剂盒方法测定胃液胃蛋白酶活力。

1.4.6 胃黏膜损伤溃疡指数的测定

切下全胃,沿胃大弯测剪开,用冰生理盐水冲洗干净,游标卡尺测量病灶长度,Guth标准^[9]评定损伤指数。

1.4.7 各组大鼠血清NO含量、血清TNF- α 、血清IL-6的测定

腹主动脉取血,离心,取上清液,按照相应试剂盒方法测定NO含量、TNF- α 、IL-6含量。

1.4.8 各组胃组织SOD、MDA、PGE₂测定

冲洗后将胃展开,加冰生理盐水制成10%胃组织匀浆液,按照相应试剂盒方法测定SOD、MDA、

PGE₂含量。表1 铁皮石斛不同组分对阿司匹林损伤GES-1细胞存活率和LDH的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 The effects of different formula of *D. officinale* on cell viability and LDH content in GES-1 cell induced by aspirin (Mean \pm SD, $n = 5$)

组别 Group	剂量 Dose (g/mL)	细胞存活率 Cell viability (%)	LDH含量 LDH content (U/L)
空白组 Control	-	100 \pm 0.95	116.43 \pm 4.48
模型组 Model	-	60.41 \pm 2.1 ^{##}	268.51 \pm 2.62 ^{##}
奥美拉唑 OPM	-	73.38 \pm 1.59 ^{* *}	209.38 \pm 6.34 ^{* *}
Fr. A	50	58.55 \pm 1.33	258.79 \pm 4.23
	100	60.62 \pm 0.86	266.44 \pm 5.27
	300	59.68 \pm 2.01	265.23 \pm 3.53
Fr. B	50	72.75 \pm 0.28 [*]	213.85 \pm 6.90 ^{* *}
	100	77.22 \pm 1.85 ^{* *}	177.55 \pm 4.43 ^{* *}
	300	81.90 \pm 1.76 ^{* *}	150.22 \pm 6.83 ^{* *}
Fr. C	50	63.19 \pm 0.19	271.10 \pm 19.23
	100	63.08 \pm 0.9	268.85 \pm 7.57
	300	62.13 \pm 2.07	264.54 \pm 7.21

注:^{##} $P < 0.01$ vs 空白组, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs 模型组。

Note: vs. control group, ^{##} $P < 0.01$; vs. model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

2.2 铁皮石斛各组分对阿司匹林诱导SD大鼠急性胃黏膜损伤的影响

2.2.1 大鼠胃黏膜组织形态观察比较

造模5 h后,正常组大鼠胃黏膜光滑,无出血现象。模型组大鼠胃黏膜有严重的条状或点状出血点,部分伴有严重充血、糜烂。铁皮石斛Fr. B组与奥美拉唑组出血点较少及少量糜烂,铁皮石斛其它各组分与模造组比无明显变化(图1)。

1.4.9 统计学方法

采用SPSS 18.1统计软件进行分析,结果以均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$),经单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 实验结果

2.1 铁皮石斛各组分抗阿司匹林致GES-1细胞氧化应激损伤作用

铁皮石斛不同组分对阿司匹林诱导GES-1细胞损伤的细胞存活率和LDH含量见表1,与空白组比较,模型组细胞活力显著降低,LDH含量明显升高($P < 0.01$);与模型相比,Fr. B组对阿司匹林诱导GES-1损伤的细胞活力随浓度增加而升高,细胞上清液LDH含量显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),Fr. A组与Fr. C组与模型组比较无显著性差异。

表1 铁皮石斛不同组分对阿司匹林损伤GES-1细胞存活率和LDH的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 The effects of different formula of *D. officinale* on cell viability and LDH content in GES-1 cell induced by aspirin (Mean \pm SD, $n = 5$)

组别 Group	剂量 Dose (g/mL)	细胞存活率 Cell viability (%)	LDH含量 LDH content (U/L)
空白组 Control	-	100 \pm 0.95	116.43 \pm 4.48
模型组 Model	-	60.41 \pm 2.1 ^{##}	268.51 \pm 2.62 ^{##}
奥美拉唑 OPM	-	73.38 \pm 1.59 ^{* *}	209.38 \pm 6.34 ^{* *}
Fr. A	50	58.55 \pm 1.33	258.79 \pm 4.23
	100	60.62 \pm 0.86	266.44 \pm 5.27
	300	59.68 \pm 2.01	265.23 \pm 3.53
Fr. B	50	72.75 \pm 0.28 [*]	213.85 \pm 6.90 ^{* *}
	100	77.22 \pm 1.85 ^{* *}	177.55 \pm 4.43 ^{* *}
	300	81.90 \pm 1.76 ^{* *}	150.22 \pm 6.83 ^{* *}
Fr. C	50	63.19 \pm 0.19	271.10 \pm 19.23
	100	63.08 \pm 0.9	268.85 \pm 7.57
	300	62.13 \pm 2.07	264.54 \pm 7.21

2.2.2 各组胃黏膜损伤指数比较

大鼠胃黏膜溃疡指数和铁皮石斛各组分对溃疡的抑制率见表2,阿司匹林组大鼠胃黏膜受损情况显示,溃疡指数显著大于空白组($P < 0.05$),说明其造模成功。与模型组比较,铁皮石斛Fr. B组和奥美拉唑组溃疡指数明显低于阿司匹林模型组($P < 0.05$),其中Fr. B组高剂量组溃疡抑制率达59.41%,铁皮石斛其它各组分与模型组无显著差异。

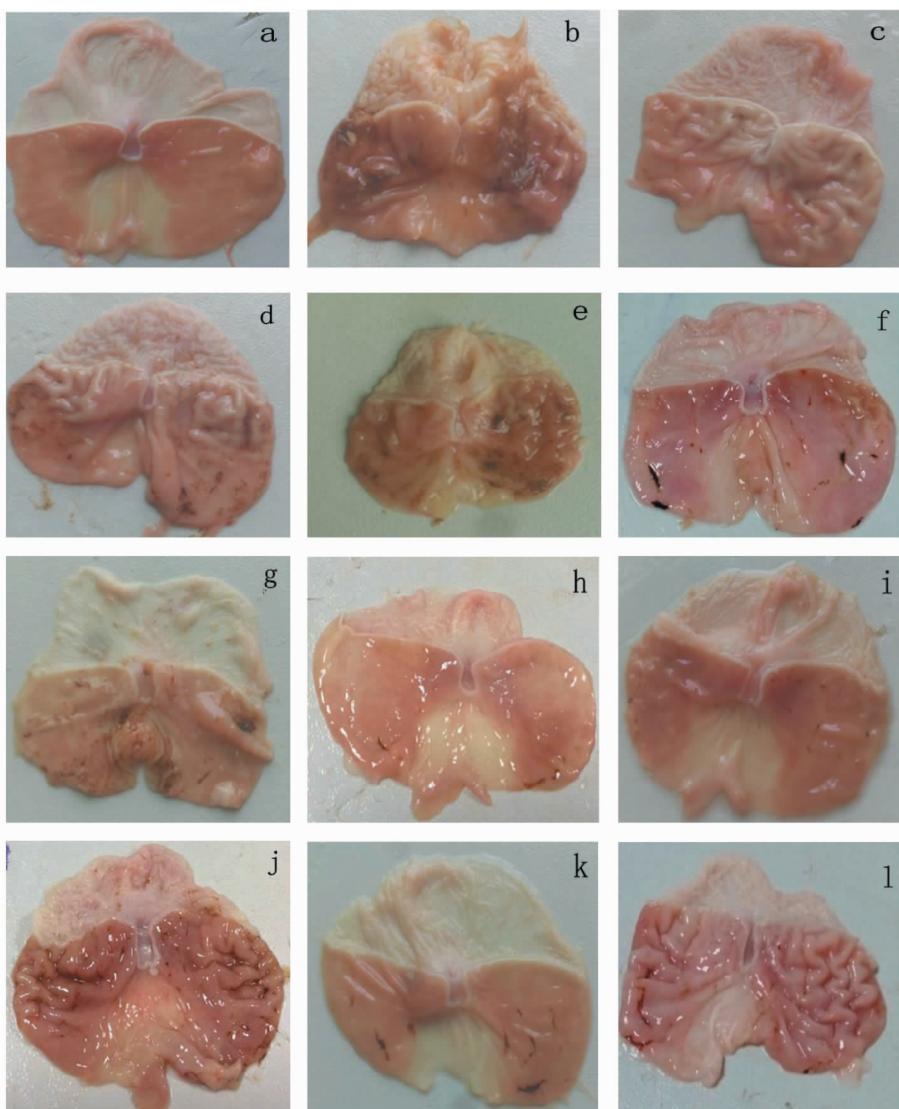


图1 空白组(a)、模型组(b)、奥美拉唑组(c)、Fr. A 低剂量组(d)、Fr. A 中剂量组(e)、Fr. A 高剂量组(f)、Fr. B 低剂量组(g)、Fr. B 中剂量组(h)、Fr. B 高剂量组(i)、Fr. C 低剂量组(j)、Fr. C 组分中剂量组(k)、Fr. C 高剂量组(l)大鼠胃组织解剖图

Fig. 1 Anatomy of the stomach of rat from control (a), model (b), OPM (c), Fr. A-low (d), Fr. A-middle (e), Fr. A-high (f), Fr. B-low (g), Fr. B-middle (h), Fr. B-high (i), Fr. C-low (j), Fr. C-middle (k) and Fr. C-high (l)

表2 铁皮石斛各组分对阿司匹林诱导的胃黏膜损伤的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 The effects of different formula of *D. officinale* on aspirin-gastric mucosa injury (Mean \pm SD, $n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/d)	溃疡指数 Ulcer index	溃疡抑制率 Inhibition rate (%)
空白组 Control	-	0	-
模型组 Model	-	$33.66 \pm 5.42^{**}$	-
奥美拉唑 OPM	-	$22.66 \pm 4.45^*$	32.67%
Fr. A	6	31.33 ± 5.88	6.92%
	12	30.83 ± 5.59	8.40%

组别 Group	剂量 Dose (g/d)	溃疡指数 Ulcer index	溃疡抑制率 Inhibition rate (%)
Fr. B	24	31.5 ± 4.67	6.41%
	6	25.66 ± 4.84 * [#]	23.80%
	12	16.16 ± 4.49 * * [#]	51.99%
Fr. C	24	13.66 ± 4.84 * * [#]	59.41%
	6	30.33 ± 3.44	9.89%
	12	30.66 ± 6.97	8.90%
	24	35.5 ± 4.76	-

注: [#]P < 0.01 vs 空白组; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs 模型组。

Note: vs. control group, [#]P < 0.01; vs. model group, * P < 0.05, ** P < 0.01.

2.2.3 铁皮石斛各组分对大鼠胃液量、总酸度、胃蛋白酶活性的影响

收集各组大鼠胃液,结果显示,与正常组比较,模型组胃液量、总酸度、胃蛋白酶活性显著升高($P <$

<0.05);与模型组比较,Fr. B 组胃液量、总酸度、胃蛋白酶活性显著降低($P < 0.05$),Fr. B 组中剂量胃液量和胃蛋白酶活性与奥美拉唑组相当,Fr. A 组、Fr. C 组与模型组无显著差异,结果见表 3。

表 3 各组大鼠胃液量、总酸度、胃蛋白酶活力的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Determination results of gastric secretion,gastric acid and pepsin in the succus gastricus of all groups (Mean ± SD, n = 8)

组别 Group	剂量 Dose (g/d)	胃液量 Gastric secretion (mL)	总酸度 Gastric acid (mol/L)	胃蛋白酶活力 Pepsin (U/mL)
空白组 Control	-	0.87 ± 0.37	0.0161 ± 0.0053	6.68 ± 3.99
模型组 Model	-	2.86 ± 0.76 [#]	0.0610 ± 0.0075 [#]	24.11 ± 4.63 [#]
奥美拉唑 OPM	-	1.59 ± 0.25 * *	0.0298 ± 0.0052 * *	14.98 ± 2.73 * *
	6	2.57 ± 0.55	0.0617 ± 0.0175	23.62 ± 5.51
	12	2.54 ± 0.52	0.0581 ± 0.0107	23.64 ± 8.11
Fr. A	24	2.60 ± 0.36	0.0531 ± 0.0093	23.47 ± 5.46
	6	2.20 ± 0.26 *	0.0519 ± 0.004	17.36 ± 3.42 *
	12	1.61 ± 0.41 * *	0.0338 ± 0.0063 * *	15.43 ± 2.79 * *
Fr. B	24	1.42 ± 0.44 * *	0.0283 ± 0.0064 * *	13.83 ± 2.51 * *
	6	2.81 ± 0.56	0.0640 ± 0.110	22.51 ± 6.95
	12	2.76 ± 0.23	0.0588 ± 0.0117	24.32 ± 5.17
Fr. C	24	2.90 ± 0.62	0.0687 ± 0.107	24.78 ± 8.22

注: [#]P < 0.01 vs 空白组。* P < 0.05, ** P < 0.01 vs 模型组。

Note: vs. control group, [#]P < 0.01; vs. model group, * P < 0.05, ** P < 0.01.

2.2.4 铁皮石斛各组分对大鼠血清中 NO、TNF-α、IL-6 影响

和奥美拉唑组大鼠血清中 NO 含量显著升高($P < 0.01$),TNF-α、IL-6 降低($P < 0.01$),铁皮石斛其余各组分无显著性差异,结果见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 NO、TNF-α、IL-6 的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of different formula of *D. officinale* on aspirin-gastric serum NO, TNF-α and IL-6 (Mean ± SD, n = 8)

组别 Group	剂量 Dose (g/d)	NO (μmol/L)	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
空白组 Control	-	30.49 ± 2.61	18.58 ± 6.49	2.60 ± 1.41
模型组 Model	-	5.75 ± 2.38	75.57 ± 7.95	18.48 ± 2.02
奥美拉唑 OPM	-	19.65 ± 3.7 * *	59.46 ± 2.72 *	10.01 ± 2.24 * *

组别 Group	剂量 Dose (g/d)	NO (μmol/L)	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
Fr. A	6	6.82 ± 2.64	72.93 ± 9.76	15.82 ± 2.00
	12	5.69 ± 1.41	72.15 ± 7.13	17.09 ± 2.23
	24	6.11 ± 1.67	74.15 ± 7.39	16.62 ± 1.98
Fr. B	6	11.45 ± 6.43	57.79 ± 6.53 *	15.04 ± 1.89
	12	16.02 ± 4.32 * *	52.61 ± 8.79 * *	13.17 ± 2.69 * *
	24	22.88 ± 6.45 * *	35.22 ± 9.29 * *	9.79 ± 1.73 * *
Fr. C	6	6.28 ± 1.29	71.71 ± 6.75	16.82 ± 1.74
	12	6.09 ± 1.68	71.10 ± 9.73	17.39 ± 2.51
	24	5.23 ± 1.85	75.56 ± 12.76	18.89 ± 4.07

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组。

Note: vs model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2.5 铁皮石斛各组分对大鼠胃组织中 SOD、MDA、PGE₂ 影响

铁皮石斛 Fr. B 组中、高剂量胃组织中 SOD 活

力和 PGE₂ 含量明显高于阿司匹林模型组 ($P < 0.01$) , MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ,

其余各组无显著性差异,结果见表 5。

表 5 各组大鼠血清中 SOD、MDA、PGE₂ 的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effects of different formula of *D. officinale* on gastric mucosa SOD, MDA and PGE₂ (Mean ± SD, $n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/d)	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	PGE ₂ (ng/L)
空白组 Control	-	396.30 ± 23.23	1.57 ± 0.22	153.56 ± 9.24
模型组 Model	-	281.87 ± 19.04	4.50 ± 0.73	73.11 ± 17.84
奥美拉唑 OPM	-	349.72 ± 24.72 * *	1.91 ± 0.18 * *	125.98 ± 9.98 * *
Fr. A	6	287.54 ± 35.38	4.52 ± 1.03	78.88 ± 15.53
	12	282.89 ± 31.57	4.38 ± 1.16	71.55 ± 16.49
	24	304.20 ± 27.58	4.27 ± 0.98	77.20 ± 12.00
Fr. B	6	318.40 ± 31.91	3.22 ± 0.73 *	100.78 ± 6.15 * *
	12	338.40 ± 24.09 * *	2.26 ± 0.53 * *	120.77 ± 10.88 * *
	24	355.23 ± 30.09 * *	1.80 ± 0.32 * *	129.78 ± 11.28 * *
Fr. C	6	295.27 ± 29.44	4.45 ± 0.87	71.55 ± 15.56
	12	294.83 ± 19.13	4.14 ± 1.53	81.29 ± 6.42
	24	280.95 ± 28.28	4.12 ± 0.88	85.81 ± 12.80

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组。

Note: vs model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论与结论

铁皮石斛作为传统中药,享有“中华九大仙草之首”的美誉,其性寒,味甘、淡、微咸,入胃、肾经,具有益胃生津、滋阴清热功效,石斛入胃经从而使胃津充足,受纳腐熟水谷、厚肠胃^[11],传统中医认为铁皮石斛能够“厚肠胃”,即铁皮石斛对胃黏膜损伤有一定的保护作用,且国内早期研究报道,铁皮石斛对急性胃溃疡有较好预防保护作用^[4,5],但活性组分

尚不明确,以及铁皮石斛对胃黏膜具体的保护作用机制尚不清晰。本研究通过建立阿司匹林致胃黏膜上皮 GES-1 细胞氧化应激损伤模型和阿司匹林诱导大鼠急性胃黏膜损伤模型,共同筛选其活性组分,并对铁皮石斛抗阿司匹林损伤大鼠胃黏膜作用和可能的机制进行探讨。

铁皮石斛各组分联合阿司匹林处理 GES-1 细胞,其实验结果显示,随剂量增大,细胞存活率增加, LDH 含量降低,初步证实了 Fr. B 组分,即铁皮石斛

多糖对受损的胃黏膜上皮细胞有较好的保护作用;复制阿司匹林损伤大鼠急性胃黏膜损伤模型,结果显示,阿司匹林组中 SD 大鼠胃黏膜损伤指数明显大于阳性组和多糖组,表明多糖组分可以抵抗阿司匹林所致的胃黏膜受损,具有保护胃黏膜的作用,与体外实验结果一致。文献报道,多糖对胃黏膜损伤有较好的效果,例如柴胡果胶多糖、黄芪多糖、香菇多糖、当归多糖等,其中柴胡果胶多糖中半乳糖醛酸多糖部分与抗胃黏膜损伤有较大的相关性^[12],铁皮石斛多糖抗胃黏膜损伤是否也与半乳糖醛酸多糖有关,需进一步研究。

胃黏膜的损伤其中一条途径为胃溃疡攻击因子的增强引起。其中,胃液的酸度增加和胃蛋白酶活力增强可刺激胃黏膜损伤,实验结果表明,铁皮石斛多糖可抑制胃黏膜受损大鼠的胃液量、酸度以及胃蛋白酶活力;氧自由基可以引起胃黏膜的脂质过氧化,引起胃黏膜损伤^[13,14],铁皮石斛多糖有效拮抗阿司匹林所致 SOD 降低,并抑制 MDA 升高,表明其具有较强的清除氧自由基能力;胃黏膜受损时,会产生大量炎症因子,包括 TNF- α 、IL-6 等,在炎症的发生发展中,TNF- α 因子与 IL-6 因子共同起协同作用^[15,16]。本研究显示,阿司匹林损伤组的炎症因子明显升高,铁皮石斛多糖组中、高剂量显著降低。

胃黏膜损伤的另外一条途径是胃溃疡保护因子的减弱。NO 是由一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸(L-Afg)合成的,对于胃保护作用主要与其增加胃粘膜血流、减轻损伤胃粘膜内中性粒细胞浸润,增加胃粘液层的厚度以及促进溃疡边缘血管增生等,另外 NO 还对 PGE₂ 的合成具有调节作用,也可能作为一种抗氧化剂在胃粘膜防御中起重要作用;PGE₂ 具有抑制胃酸分泌,增加胃黏膜黏液及碳酸氢盐分泌和增加黏膜血流的作用^[17,18]。本研究表明:铁皮石斛多糖中、高剂量能显著改善阿司匹林导致大鼠胃黏膜损伤引起的 NO、PGE₂ 降低。

综上所述,经实验结果证实铁皮石斛抗急性胃黏膜损伤的活性部位主要是多糖组分,一方面多糖组分可以减弱胃液总酸度、胃蛋白酶活性等胃溃疡攻击因子,并清除氧自由基,降低炎症反应介质 TNF- α 含量和 IL-6 含量的产生;另一方面多糖还可以增强 NO、PGE₂ 等胃黏膜保护因子,增加血流量,以供给大量营养于受损部位。

参考文献

1 Li L (李玲), Deng XL (邓晓兰), Zhao XB (赵兴兵), et

- al.* Advances in studies on chemical constituents in *Dendrobium candidum* and their pharmacological effects. *Anti-tumor Pharm* (肿瘤药学), 2011, 1:90-93.
- 2 Li J (李娟), Li SX (李顺祥), Huang D (黄丹), et al. Advances in the of resources, constituents and pharmacological effects of *Dendrobium officinale*. *Sci Technol Rev* (科技导报), 2011, 19:74-79.
- 3 Liu L (刘莉), Zhang T (张庭), Pan J (潘俊), et al. The research progress of *Dendrobium officinale* resources. *J Shandong Agric Biol* (山东农业生物学报), 2014, 33:83-87.
- 4 Feng X (冯霞), Zhao X (赵欣). Extract of *Dendrobium officinale* for SD rat stomach injury prevention effect. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2012, 4:294-296.
- 5 Liang CY (梁楚燕), Li HB (李焕彬), Hou SZ (侯少贞), et al. Protective effect of *Dendrobium officinale* on experimental liver injury and gastric ulcer in mice. *World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med* (世界科学技术—中医药现代化★中药研究), 2013, 15:233-236.
- 6 Luo AX, He XJ, Zou SD, et al. In vitro antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide derived from *Dendrobium nobile* Lindl. *Biol Macromolecules*, 2009, 45:359-363.
- 7 Du J, Li XH, Zhang W, et al. Involvement of glutamate-cysteine/glutamate transporter system in aspirin-induced acute gastric mucosa injure. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450:135-141.
- 8 Sun Y (孙沂), Fan HW (樊宏伟), Wang SK (王书奎), et al. Effect of combined aspirin and clopidgrel on proliferation of human gastric epithelial cell line GES-1. *Chin J Gastroenterol Hepatol* (胃肠病学和肝病学杂志), 2010, 19: 520-523.
- 9 Xiao ZB (肖志彬), Liu XL (刘小雷), Cheng RQ (成日青), et al. Influence of β -sitosterol on gastric mucosal side effect induced by aspirin and its pharmacological functions. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学), 2016, 22:148-152.
- 10 Mu FH (牟方宏), Hu FL (胡伏莲), Wei H (魏红), et al. Protective effect of compound bismuth and magnesium granules on aspirin-induced gastric mucosal injury in rats. *Nat Med J China* (中华医学杂志), 2016, 96:464-467.
- 11 Yin HH (印会河), Tong Y (童瑶). Basic Theory of Traditional Chinese Medicine (中医基础理论,2 版). Beijing: People's Medical Publishing House, 2007. 135-135.
- 12 Wang L (王蕾), Zhou SY (周四元), Mei QB (梅其炳). The research progress of polysaccharide treatment of gastric ulcer. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25:654-655.

(下转第 1746 页)