

胃肠宁颗粒对小鼠急性溃疡模型的影响

吴白芬^{1,2} 浦仕彪¹ 尚 李¹ 尚 怡¹ 周志宏^{1*}

1.云南中医药大学 云南昆明 650500

2.云南经济管理学院 云南昆明 650106

摘要:目的 为了考察临床经验方胃肠宁预防给药对实验性小鼠急性溃疡的防治作用。**方法** 采用乙醇、利血平和幽门结扎等方式致小鼠急性胃溃疡模型,并考察胃肠宁对溃疡指数、胃蛋白酶等指标的影响。**结果** 胃肠宁预防给药对溃疡指数、胃蛋白酶等指标均有不同程度的改善。与模型组相比:胃肠宁可明显降低胃溃疡小鼠的胃溃疡指数($P < 0.05/0.01$),且小鼠胃粘膜出血或溃疡程度均有所减轻;幽门结扎小鼠胃蛋白酶活性均明显降低($P < 0.05/0.01$),其中胃肠宁中、低剂量组还可明显增加胃组织匀浆中的 PGE2 水平($P < 0.05/0.01$)。**结论** 胃肠宁对实验性小鼠急性胃溃疡有一定防治作用,具体作用机制有待进一步研究。

关键词: 胃肠宁颗粒; 急性胃溃疡; 石斛; 白芨; 美洲大蠊

Effect of Weichangning Granules on acute gastric ulcer in mice

Baifen Wu^{1,2}, Shibiao Pu¹, Li Shang¹, Yi Shang¹, Zhihong Zhou^{1*}

1.Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2.Yunnan University of business management, Kunming 650106, China

Abstract: To investigate the protective effect of Weichangning Granules on experimental acute gastric ulcer in mice. **Methods:** Acute gastric ulcer models of mice induced by absolute ethanol, reserpine and pylorus ligation were established to study effects of Weichangyanning Granules. **Results:** Weichangning Granules preventive administration can improve ulcer index, pepsin and other indicators to varying degrees. Compared with the model group, Weichangning Granules could significantly reduce the gastric ulcer index ($P < 0.05 / 0.01$), and the degree of gastric mucosal bleeding or ulcer was reduced; the pepsin activity in pyloric ligation mice was significantly decreased ($P < 0.05 / 0.01$), and the PGE2 level in gastric tissue homogenate was significantly increased in the middle and low dose groups of Weichangning Granules ($P < 0.05 / 0.01$). **Conclusion:** Weichangning Granules has a certain preventive and therapeutic effect on experimental acute gastric ulcer in mice, and the specific mechanism needs to be further studied.

Keywords: Weichangning Granules; Acute gastric ulcer; Dendrobium candidum; Bletilla striata; Periplaneta americana

消化性溃疡发病率较高,主要症状表现为腹胀、反酸、嗳气,或伴有胃部疼痛,疼痛呈慢性或周期性^[1]。消化性溃疡西医药主要用酸抑制和中和剂为基础,同时保护胃黏膜,调节胃动力,促进溃疡的愈合,并根据病情应用抗菌药物,但长期、反复用药也给患者带来了潜在的安全隐患^[2]。中医中药在消除消化性溃疡攻击因子等方面显示了优势,其高治愈率、高愈合质量及较强的抗复发作用,为疾病的治疗及防止复发提供了更有效的方法^[3,4]。胃肠宁颗粒是云南省已故名中医吴生元教授的临床经验方,由美洲大蠊、白芨和铁皮石斛三味药组成,临床上根据病情各药均有加减,前文已经报道了采用均匀设计法对组方进行了优化研究^[5]。本文采用无水乙醇、利血平、幽门结扎致小鼠急性胃溃疡模型,通过溃疡指数测定,考察所得优化处方预防给药对急性胃粘膜损伤的保护作用,以期临床用药及深入开发提供科学指导。

一、实验材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠,5~8 周龄,体重 22~36g,由成都达硕实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(川)2015-030,发证机关:四川省科学技术厅。

1.2 试剂

无水乙醇(AR)500mL/瓶,天津市风船化学试剂科技有限公司出品(批号 20180707)。无水甲醇(AR)500mL/瓶,天津市风船化学试剂科技有限公司出品(批号 20160815)。利血平(CR)1g/瓶,上海源叶生物科技有限公司出品(批号 X04A9Y56856),实验时用 0.2%吐温-80 及生理盐水配制成 1.2 mg/mL 浓度的混悬液按 10mL/kg 皮下注射用于小鼠急性胃溃疡造模用。氢氧化钾(AR)500g/瓶,天津市风船化学试剂科技有限公司出品(批号 20170109)。pH 0.5~5.0 精

密试纸, 上海三爱思试剂有限公司 (批号 20190212)。0.9% 氯化钠注射液 (生理盐水), 国药准字 H53020469, 500 mL/瓶, 昆明南疆制药有限公司出品 (批号 A170114d), 用于小鼠胃内注射及洗胃。戊巴比妥钠, 德国 FLUK 公司进口分装 (批号 20181225), 用氯化钠注射液配制成 5 mg/mL 供小鼠麻醉用, 注射体积 10 mL/kg, 麻醉剂量 50mg/kg。水合氯醛 (AR) 250g/瓶, 山东西亚化学工业有限公司出品 (批号 119957), 用氯化钠注射液配制成 36mg/mL 溶液供小鼠麻醉用, 注射体积 10 mL/kg, 麻醉剂量 360mg/kg。吐温-80 (CR) 500mL/瓶, 天津市风船化学试剂科技有限公司出品 (批号 20181010), 用于利血平造模剂的配制。胃蛋白酶 50T/24 样 (批号 20191108) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所出品。PEG2 试剂盒, 上海源叶生物技术有限公司出品 (批号 201909)。

1.3 仪器

DENVER INSTRUMENT 电子分析天平; HX602Z 电子天平; Multiskan go 全波长酶标仪; Biofuge 冷冻离心机; Milli-Q 超纯水机; Tissuelyser II 高速组织破碎仪; 0~150mm 数显游标卡尺; BCD-248WBJV 型海尔冰箱; 10~100uL、100~1000uL 移液器; 烧杯、量筒、剪刀、眼科弯镊、止血钳及其它耗材均为国产。

1.4 受试药物

胃肠宁颗粒由美洲大蠊、白芨超微粉、石斛超微粉按 3 : 1 : 1 组成 (自制)。盐酸雷尼替丁胶囊, 国药准字 H13022482, 石家庄四药有限公司生产 (批号 LN18051401), 实验时用纯水研磨后配制成 2.5mg/mL 浓度的混悬液供小鼠灌胃用 (按小鼠体重 50mg/kg 给药)。奥美拉唑肠溶胶囊, 国药准字 H20033484, 修正药业集团长春高新制药有限公司出品 (批号 180502), 实验时采用纯水研磨后配制成 0.25mg/mL 浓度的混悬液供小鼠灌胃用 (按小鼠体重 5mg/kg 给药)。康复新液, 国药准字 Z51021834, 四川好医生攀西药业有限责任公司生产 (批号 190305), 实验时采用纯水稀释一倍 (0.5mL/mL) 供小鼠灌胃用 (按小鼠体重 5mL/kg 给药)。

1.5 数据分析

采用 SPSS17 统计软件, 计量资料以均数±标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析法; 方差齐采用 LSD 法检验, 方差不齐采用 Tamhane's 法检验; $p < 0.05$ 有统计学意义, $p < 0.01$ 有显著统计学意义。

二、实验方法与结果

2.1 对无水乙醇致小鼠急性胃溃疡的影响

取 24~26g 雄性 ICR 小鼠, 按体重分层后随机分为 8 组: 正常对照组; 模型对照组; 阳性对照雷尼替丁 50mg/kg、奥美拉唑 5mg/kg、康复新液 10mL/kg 组; 胃肠宁 2.0、1.0、0.5g/kg 三剂量组。各组动物每日按剂量灌胃给药 1 次, 连续 7 天, 容积均为 20mL/kg。末次给药前禁食不禁水 24h, 末次给药后 1h, 除正常对照组外, 各造模动物均按 0.1mL/10g 灌胃给予无水乙醇。造模后 1h, 脱颈椎处死动物, 结扎幽门和贲门, 并向胃内注射生理盐水 2mL, 游离并剪下整个胃, 浸泡于 10% 福尔马林液中固定 10min, 沿胃大弯切开, 观察并按 Guth 标准计算溃疡指数和抑制率。结果见表 1 及图 1。

表 1 对无水乙醇致小鼠胃溃疡的影响

组别	剂量(/kg)	动物数 (只)	溃疡指数 ($\bar{x} \pm SD$, 分)	抑制率 (%)
对照	20 mL	12	0.0±0.0	—
模型	20 mL	12	20.5±7.0 ^{▲▲}	—
雷尼替丁	50 mg	12	12.0±6.8 ^{**}	41.46
奥美拉唑	5 mg	12	13.6±10.1	33.48
康复新	10mL	12	13.0±9.9 [*]	36.59
胃肠炎宁高	2.0 g	12	12.0±7.7 ^{**}	41.46
胃肠炎宁中	1.0 g	12	11.0±4.3 ^{**}	46.34
胃肠炎宁低	0.5 g	12	10.0±7.8 ^{**}	51.22

与对照组相比: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组相比: ^{*}/^{**}
 $P < 0.05/0.01$

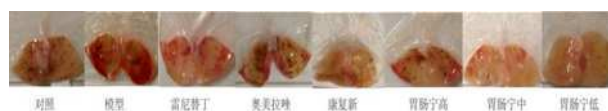


图 2 无水乙醇致小鼠胃粘膜损伤图示

由表 1 及图 1 可见, 正常对照组小鼠胃组织颜色正常, 无溃疡面和出血点; 与正常对照组相比, 模型组小鼠胃内壁均有不同程度的线状出血或片状溃疡或糜烂面, 甚至大量出血形成连成片的出血面, 并有严重糜烂和溃疡现象, 表明无水乙醇诱导小鼠胃溃疡模型成功; 与模型组相比, 各给药组的胃粘膜损伤均有不同程度减轻, 除奥美拉唑的抑制作用接近统计学差异 ($P > 0.05$) 外, 其余各给药组均可明显降低模型小鼠的溃疡指数 ($P < 0.05/0.01$); 其中, 胃肠炎宁的作用强于康复新。以上数据表明, 胃肠炎宁以 2.0、1.0、0.5g/kg 剂量连续灌胃 7 天, 对无水乙醇致小鼠胃粘膜损伤具有明显保护作用。

2.2 对利血平致小鼠急性胃溃疡的影响

选用 22~24g 雄性 ICR 小鼠 96 只, 随机分为 8 组: 正常对照组; 模型对照组; 阳性对照雷尼替丁 50mg/kg、奥美拉唑 5mg/kg、康复新液 10mL/kg 组; 胃肠宁 2.0、1.0、0.5g/kg 三剂量组; 每组 12 只。各组动物每日按剂量灌胃给药 1 次, 连续 7 天, 容积均为 20mL/kg。末次给药前禁食不禁水 24h, 末次给药后 1h, 除正常对照组外, 其余各组均以 12mg/kg 剂量皮下注射利血平。造模后 24h, 脱颈椎处死小鼠, 剖腹取胃, 沿胃大弯剪开, 测定胃液 pH 值后, 用冰生理清洗干净, 平铺于滤纸上, 观察并测定溃疡指数, 计算抑制率; 最后取各鼠左侧胃组织制备 10%生理盐水匀浆, 按文献方法^[6]测定胃组织中的 PGE。结果见表 2 和图 2。

表 2 对利血平致小鼠胃溃疡的影响

组别	剂量 (/kg g)	动物 数 (只)	溃疡指 数 ($\bar{x} \pm S$ D, 分)	抑制 率 (%)	胃液pH值	PGE2 ($\bar{x} \pm SD$, OD)
对照	20 mL	12	0.0±0.0	—	2.50±0.71	3.169±0.052
模型	20 mL	12	8.8±4.7 ▲▲	—	1.71±0.45▲	3.156±0.069
雷尼 替丁	50 mg	12	3.0±2.9* *	65.71	2.00±0.48	3.173±0.090
奥美 拉唑	5 mg	12	4.2±2.7* *	51.43	1.96±0.66	3.171±0.051
康复 新	10m L	12	5.8±3.9	34.29	1.58±0.42	3.159±0.035
胃肠 宁高	2.0 g	12	4.5±2.7*	48.57	1.83±0.33	3.152±0.049
胃肠 宁中	1.0 g	12	5.0±3.7*	42.86	1.88±0.43	3.152±0.054
胃肠 宁低	0.5 g	12	4.5±2.7*	48.57	1.75±0.45	3.136±0.046

与对照组相比: ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组相比: */ **
 $P < 0.05/0.01$



图 2 利血平致小鼠胃粘膜损伤图示

由表 2 及图 2 可见, 正常对照组小鼠胃粘膜色泽正常, 无溃疡面和出血点; 与正常对照相比, 模型组小鼠胃液 pH 值明显降低 ($P < 0.01$), 胃粘膜点、线状出血或溃疡明显 ($P < 0.01$), 胃组织中 PGE2 无明显变化 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 各给药组溃疡情况有所减轻, 除康复新组仅有抑制趋势 ($P > 0.05$) 外, 其余各组均能明显降低模型小鼠的溃疡指数 ($P < 0.05/0.01$), 但对胃液 pH 值仅有提升的趋势而无统

计学差异 ($P > 0.05$), 对胃组织中 PGE2 无明显影响 ($P > 0.05$); 其中, 阳性对照雷尼替丁及奥美拉唑对溃疡抑制作用最强, 胃肠宁作用强于康复新。以上数据说明, 胃肠炎宁以 2.0、1.0、0.5g/kg 剂量给连续灌胃给药 7 天, 对利血平致小鼠急性胃溃疡有较好的保护作用, 能减轻胃黏膜损伤程度, 降低溃疡指数, 明显抑制溃疡形成, 减少溃疡发生率。

2.3 对幽门结扎小鼠胃溃疡的影响

选用 32~36g 雄性 ICR 小鼠 72 只, 随机分为 6 组: 模型对照组; 阳性对照雷尼替丁 50mg/kg、康复新液 10mL/kg 组; 胃肠宁 2.0、1.0、0.5g/kg 三剂量组; 每组 12 只。各组动物每日按剂量灌胃给药 1 次, 连续 10 天, 容积均为 20mL/kg。末次给药前禁食不禁水 24h, 末次给药后 3h, 用 360mg/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉动物, 行幽门结扎术后禁食禁水 14h。脱颈椎处死小鼠, 剪开腹腔, 结扎贲门, 剪下整个胃脏, 测定胃液体积、胃液 pH 值、胃液中胃蛋白酶及胃组织中 PGE2, 沿胃大弯切开, 用生理盐水清洗后, 平铺于滤纸上, 观察并用 Okabe 法^[7]评价溃疡指数, 计算抑制率。结果见表 3 及图 3。

评价标准: ① 0 分: 无损伤; ② 1 分: 红肿; ③ 2 分: 轻度损伤, 1~7 个小溃疡, 直径或长度 < 3 mm; ④ 3 分: 较大损伤, 1~3 个大溃疡, 直径或长度 > 3 mm 或多于 7 个小溃疡; ⑤ 4 分: 严重溃疡, 多于 3 个大溃疡; ⑥ 5 分: 溃疡穿孔。

由表 3 及图 3 可见, 与模型组相比, 各给药组小鼠胃粘膜出血或溃疡程度减轻, 溃疡指数明显下降 ($P < 0.05/0.01$), 以雷尼替丁及胃肠炎宁低剂量组作用最佳; 各给药组的胃液 pH 值及死亡率无明显影响 ($P > 0.05$)。

表 3 对幽门结扎小鼠溃疡指数及胃液 pH 值的影响

组别	剂量 (/kg)	动物 数 (只)	溃疡指数 ($\bar{x} \pm SD$, 分)	抑制 率 (%)	胃液pH 值 ($\bar{x} \pm$ SD)	术后 死亡率
模型	20 mL	13	3.0±0.8	—	3.08±1.00	2/12
雷尼 替丁	50 mg	13	1.5±1.0**	48.72	3.42±0.86	0/12
康复 新	10mL	13	1.9±0.8*	35.90	3.50±0.96	3/12
胃肠 宁高	2.0 g	13	1.8±1.2**	41.03	3.23±0.86	0/12
胃肠 宁中	1.0 g	13	1.9±1.6*	35.90	3.35±0.94	3/12
胃肠 宁低	0.5 g	13	1.6±1.3**	46.15	3.27±0.88	0/12

与模型组相比: */ ** $P < 0.05/0.01$



图3 幽门结扎小鼠胃粘膜损伤图示

由表4可见,与模型组相比,各给药组小鼠胃液量有不同程度减少,以雷尼替丁和胃肠炎宁中剂量组为显著($P<0.05$);各组胃蛋白酶活性均明显低于模型对照组($P<0.05/0.01$),其中,雷尼替丁及胃肠炎宁中、低剂量组还可明显增加胃组织匀浆中的PGE2水平($P<0.05/0.01$)。

表4 对幽门结扎小鼠胃液体积、胃蛋白酶及PGE2的影响

组别	剂量 (/kg)	动物 数 (只)	胃液体积 ($\bar{x} \pm SD$, mL)	胃蛋白酶 ($\bar{x} \pm SD$, U/ mL)	PGE2 ($\bar{x} \pm SD$, OD)
模型	20 mL	13	2.43±0.88	49.88±14.51	3.174±0.073
雷尼替丁	50 mg	13	1.44±0.89*	24.55±10.92* *	3.265±0.093*
康复新	10m L	13	2.23±0.70	36.32±13.58*	3.242±0.099
胃肠宁高	2.0 g	13	1.93±0.62	34.73±17.18*	3.228±0.085
胃肠宁中	1.0 g	13	1.44±0.99*	35.40±15.59*	3.260±0.071**
胃肠宁低	0.5 g	13	1.97±0.96	36.36±15.50*	3.235±0.071*

与模型组相比: */ ** $P<0.05/0.01$

三、讨论与小结

3.1 模型选择

高浓度乙醇可抑制胃排空,对胃组织产生脱水、凝固组织蛋白、腐蚀等作用,直接造成急性胃粘膜损伤^[6]。无水乙醇诱导的大小鼠溃疡模型,较好地模拟了人类饮酒过多所致急性胃溃疡,在溃疡外形、组织学特点与人类胃溃疡相似,且愈合和复发过程也有相近,是药物筛选的常用经典模型。该模型操作简单,重复性好,损伤多发生在腺胃部,表现为糜烂、红肿、有条状或点状出血,可通过对溃疡指数的测定考察药物对溃疡的保护作用。本研究结果表明,小鼠以0.5、1.0、2.0g/kg剂量连续给予胃肠炎宁7天,可明显减轻无水乙醇对胃粘膜的损伤,降低溃疡指数,抑制溃疡形成。

利血平为肾上腺能神经元阻断药,是急性胃溃疡较好的诱发剂,主要作用为抑制交感神经系统功能,使得副交感神经系统的功能相对占优势,以致消化功能亢进,促使胃酸分

泌增加以及胃粘膜局部缺血导致溃疡产生^[7]。本研究中,前期实验时利血平模型采用造模后分组进行5天治疗给药,结果动物因造模后递质耗绝,体温降低、自主活动消失,尽管采取了补充葡萄糖水等支持手段,还是不能逆转动物的大量死亡,至5天给药结束时,模型组、雷尼替丁、奥美拉唑、康复新、胃肠宁高、中、低剂量的死亡率分别为10/12、7/12、9/12、10/12、8/12、7/12、6/12。后期重复实验时,采用预防给药7天、造模24h的观察,结果表明:小鼠以0.5、1.0、2.0g/kg剂量连续给予胃肠炎宁7天,可明显减轻利血平致急性溃疡模型小鼠的胃粘膜损伤,降低溃疡指数,抑制溃疡形成。

幽门结扎后,胃排空受限,胃内压力增高,胃液分泌增加并在胃内停留时间延长,导致损伤因素增加,形成急性胃溃疡^[8],也是传统经典的急性胃溃疡动物模型之一,广泛用于药物筛选。本研究表明,将实验术后取材时间缩短至14小时,并加强术后管理,使取材时动物死亡率明显降低。结果表明,小鼠以0.5、1.0、2.0g/kg剂量连续灌胃予胃肠炎宁10天,可明显降低幽门结扎模型小鼠的溃疡指数,明显降低胃蛋白酶活性,降低胃液体积,提高胃组织中PGE2的水平;也说明胃肠炎宁对幽门结扎溃疡小鼠的保护作用与减少胃液分泌、抑制胃蛋白酶活性及提高PGE2生成有关,即与调整损伤因子与保护因子的失衡有关。

3.2 剂量选择

本研究依据小鼠等效剂量的计算结果及取样的方便性,阳性对照雷尼替丁与奥美拉唑的试验结果欠佳,可能是实验剂量分别设置为50mg/kg、5mg/kg偏低有关^[9]。胃肠炎宁在实验研究中的药效作用无剂量依赖性,且多个实验中以低剂量作用更突出,分析认为可能与过高浓度影响了药物活性成分的吸收有关,同时也提示胃肠炎宁活性较高,对临床应用有更高的安全窗口。

本研究结果表明,小鼠药效试验最低有效剂量为0.5g/kg,根据文献公式^[11] $D_b=D_a \cdot R_{ab}$ ($R_{ab}=0.081$),60kg体重人体的等效剂量为2.43g/日,按误差允许范围为0.5~1倍的原则,得出临床拟用剂量约为1.2~2.4g/日,建议以0.5~1.0g/次、3次/日,即1.5~3.0为临床试验的拟用剂量,但该剂量只是理论值,还有待于在临床试验中进一步确认。

3.3 小结

胃肠炎宁可明显降低乙醇、利血平、幽门结扎模型小鼠的胃溃疡指数,改善胃粘膜损伤的组织形态;减少胃液分泌,抑制胃蛋白酶的活性。提示:胃肠炎宁对急性胃溃疡小鼠具有

一定的保护作用,其机制可能与减少胃液分泌、抑制胃蛋白酶活性及提高 PGE2 生成有关,即与调整损伤因子与保护因子的失衡有关;具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 韩俊江.奥美拉唑联合药物治疗胃溃疡的研究进展[J].中国城乡企业卫生,2022,4(4):68~70.

[2] 廖申坤,唐燕.奥美拉唑与雷尼替丁治疗十二指肠溃疡的疗效比较[J].临床合理用药杂志,2022,15(31):19~22.

[3] 蔡玉丽,戴高中.中医药防治消化性溃疡的临床研究进展[J].智慧健康,2020,6(4):48~51.

[4] 张雪琴,梁海生.中药治疗胃溃疡及抗复发研究进展[J].实用中医药杂志,2007,23(3):202~203.

[5] 浦仕彪,王钺涵,杨竹雅,等.均匀设计法对临床方剂胃脘宁颗粒组方优化研究[J].云南民族大学学报(自然科学

版),2021,30(4):343~346.

[6] 邓源,于红,李秀敏,等.乙醇对胃黏膜的损伤作用[J].华北国防医药,2006,18(5):327~329.

[7] 卢文丽,方肇勤,潘志强,等.6种胃溃疡小鼠模型的证候特征及比较[J].上海中医药杂志,2007,41(8):63~68.

[8] Shay H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat [J]. Gastroenterology,1945,5:43~61.

[9] 朴志勇,宋维良.奥美拉唑治疗十二指肠溃疡疗效分析[J].中国误诊学杂志,2007,7(17):3966~3967.

基金项目:云南省生物医药重大科技专项(2019ZF005)

第一作者:吴白芬(1991-),女,汉族,助教,硕士,研究方向:中药资源的开发与利用。

*通讯作者:周志宏(1971-),男,汉族,研究员。研究方向:中药质量控制。