

乌梅水煎物对实验性溃疡性结肠炎小鼠的作用

何爱明¹, 王乙林¹, 林世明² (1. 福建师范大学福清分校生物与化学工程系, 福建 福清 350300; 2. 福建省福清卫生学校药理教研组, 福建 福清 350300)

[摘要] 目的 探讨乌梅对溃疡性结肠炎(UC)小鼠结肠组织过氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的影响。方法 采用3%葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液给小鼠自由饮水,建立小鼠溃疡性结肠炎模型,造模成功后,正常组、模型组给予0.33 ml生理盐水灌胃,乌梅低、中、高剂量组分别按设计剂量灌胃,每天1次,均连续给药10 d,期间进行隐血试验和观察粪便性状以及进行疾病活动度(DAI)评分;肉眼观察结合显微镜观察结肠组织形态学评分;测定病变结肠组织中SOD活性与MDA含量。结果 发现乌梅中、高剂量组的小鼠无肉眼血便,可见松散大便。乌梅低、中、高剂量组的DAI均降低,中、高剂量组与模型组比较具有极显著性差异($P < 0.01$)。在结肠黏膜病理改变中,乌梅高剂量组黏膜糜烂不严重,溃疡小,黏膜充血、水肿程度轻;在测定的SOD活力值中,中、高剂量组与模型组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),均明显高于模型组。中剂量组与正常组比较具有显著性差异($P < 0.05$),高剂量组与正常组比较无显著性差异。测得MDA含量中,中、高剂量组与模型组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),均明显低于模型组。结论 提示自由基与UC的结肠组织损伤密切相关,参考UC的病理过程,乌梅对UC有明显治疗效果,并可能通过提高病变组织的SOD活性与降低MDA含量来发挥治疗作用。

[关键词] 乌梅; 溃疡性结肠炎; 过氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] R65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)05-0357-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.05.011

The effect of *Fructus Mume* water extract on experimental ulcerative colitis in mice

HE Ai-ming¹, WANG Yi-hui¹, LIN Shi-ming² (1. Department of biology and chemistry, Fuqing branch of Fujian normal university, Fuqing 350300, China; 2. Department of pharmacology, Fuqing health school of Fujian Province, Fuqing 350300, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of *Fructus Mume* (FM) on superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in ulcerative colitis in mouse. **Methods** The mouse model of ulcerative colitis was set up by giving 3% dextran sulfate sodium (DSS) solution to the mouse as free drinking water, the normal group, model group were given 0.33 ml 0.9% NaCl, while FM high, middle and low dose groups were given the designed dosage by intragastric administration once a day, and last for 10 days. The occult blood test, observation of stool and the disease activity score (DAI) were observed. The colonic tissue morphology score was observed by visual inspection combined with microscope; SOD activity and MDA content of the lesions colon tissue were determined. **Results** The groups of FM high and middle dose had loose stools but no visible blood. DAI of all groups had decreased. There was significant difference ($P < 0.01$) in DAI between middle and high dose groups with model group. In the colonic mucosal pathological changes, FM high dose group had no severe mucosal erosion, ulcer, mucosal hyperemia and edema degree of light. In the determination of the activity of SOD value, FM high dose group, compared with the model group was significant difference ($P < 0.01$), higher than that in the model group. FM middle dose group compared with the normal group was significant difference ($P < 0.05$). There were no significant difference between FM high dose group and normal group. The measured MDA content, FM high dose group compared with the model group was significant difference ($P < 0.01$), which was lower than that in the model group. **Conclusions** Free radicals were closely related to UC colonic tissue damage, which participated in UC pathological process. FM had obvious therapeutic effect on UC, and it might play a therapeutic role by enhancing the lesion tissue SOD activity and lower MDA content in UC.

[Key words] FM; ulcerative colitis; SOD; MDA

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称为非特异性溃疡性结肠炎,是炎症性肠病的一种,是临床

常见的一种消化道疾病,严重影响人类的健康,本病病变主要限于黏膜及黏膜下层,呈连续性非节段性分布,多累及直肠、乙状结肠、左半结肠。临床主要表现为腹痛、腹泻、黏液样血便、或有便秘、腹胀等消

[作者简介] 何爱明(1967-)女,硕士,副教授。Tel: 13314929563, E-mail: 21947911@qq.com.

化道症状,常反复发作、缠绵难愈。其病因及发病机制尚未明确。近年来自由基在 UC 发病机制中的作用已成为研究的重要课题。研究提示,UC 的发生、发展与氧自由基诱发的脂质过氧化有关^[1]。

多年来,许多学者探索应用中医药治疗 UC,乌梅丸被广泛运用于 UC 的临床治疗^[2-4],收到很肯定的疗效,但均未究其作用机制。乌梅(*Fructus Mume*)是由蔷薇科植物梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)的干燥近成熟果实加工而成。乌梅始载于《神农本草经》,列为中品。《中国药典》2010 年版一部收载的“乌梅”正品有乌梅、乌梅肉和乌梅炭 3 种,其性味归经皆为酸、涩、平。归肝、脾、肺、大肠经。其功能主治为敛肺、涩肠、生津、安蛔。用于肺虚久咳、久痢滑肠、虚热消渴、蛔厥呕吐腹痛;胆道蛔虫症。

本文通过测定过氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醇(MDA)含量水平的变化,进行探讨乌梅对化学试剂诱导的小鼠 UC 的作用及作用机制,以期为进一步研究提供依据。

1 材料

1.1 试剂与药品 SOD、MDA 试剂盒购于南京建成生物工程公司。其余试剂均为分析纯。

乌梅购于宜又佳连锁药店,由云南白药集团天紫红药业有限公司昆明中药饮片厂生产,取乌梅(去核)加 6 倍量水,加热煮沸 30 min,双层纱布过滤,滤渣再加同样量水,加热煮沸 30 min,双层纱布过滤,合并滤液于水浴加热浓缩至所需浓度备用^[5]。《中国药典》2005 年版一部规定人用剂量为 6~12 g/d,因药材水煮浓缩后制备出来的供试液极其黏稠,故高剂量组的给药浓度设定为 0.4 g/ml、10 ml/kg。小鼠低、中、高剂量按成人最大剂量的 5、10、15 倍给药,即 2、4、6 g 生药/(kg·d)。葡聚糖硫酸钠(DSS)为上海前生生物科技有限公司产品。

1.2 仪器 恒温水浴箱为江苏省太仓医疗器械厂产品,低温离心机为珠海黑马医学仪器公司产品。

1.3 动物 健康昆明种小鼠,SPF 级,雄性,体重为(20±2)g,90 只。由福建医科大学实验动物中心提供,合格证号:闽实动质准第 00205 号。

2 方法

2.1 造模方法 动物适应性饲养 1 周后,按体重大小随机分为正常组、模型组、乌梅低、中、高剂量组 5 组,每组 15 只。动物禁食不禁水 24 h,留取正常组 15 只动物,其余 60 只小鼠再参照文献报

道^[6],用 3% DSS(分子量 500 000)溶液给小鼠自由饮水,连续 7 d。造模期间每天观察小鼠性状、饮食、毛发、活泼状态等。模型建立成功的标志为饮用 3% DSS 后出现稀便、腹泻、大便隐血(+)或肉眼血便的任一症状。选取造模成功的小鼠随机分入各组。

2.2 给药与标本处理方法 造模成功后,即造模第 8 天开始灌胃,正常组、模型组分别给予 0.33 ml 生理盐水灌胃,乌梅低、中、高剂量组分别按设计剂量给药。每天一次,均连续给药 10 d。期间除正常组小鼠自由饮用生理盐水,其他各组小鼠自由饮用 3% DSS 水溶液,并且每天定时称量小鼠体重,进行隐血试验和观察粪便性状。分别在试验第 5 天、第 10 天,将小鼠称重,并放入代谢笼中,收集小鼠大便,记录大便性状,且取部分粪便测定隐血。进行疾病活动度(DAI)评分,评分标准见表 1。DAI = 体重下降分数 + 大便性状分数 + 隐血分数。

表 1 疾病活动度评分

评分	体重下降	大便形状	隐血
0	无	正常	正常
1	1-5	松软	±
2	6-10	松软	+
3	11-15	腹泻	++
4	>15	腹泻	鲜血

2.3 组织形态学评分标准与方法 给药结束后脱颈处死小鼠,剪开腹腔,取全段结肠,剪开,生理盐水洗干净,平铺于白板上置于放大镜下肉眼观察结肠大体形态、结肠黏膜损伤情况;将固定的结肠组织进行常规石蜡包埋、切片、HE 染色,显微镜下观察结肠组织形态学变化。按评分标准^[7]进行组织形态学评分。

2.4 SOD、MDA 的测定 取炎症改变最明显处的结肠黏膜组织,湿重 200 mg,用 4℃冰生理盐水洗净,除去血污,滤纸吸干,称重用匀浆器在冰浴条件下制成匀浆,低温离心机 4 000 r/min 离心 15 min,取适量上清液分装于 EP 管,-20℃保存,按试剂盒说明操作检测 SOD 活力及 MDA 含量。

2.5 统计学分析 实验数据应用 SPSS11.0 统计软件进行处理。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)经方差齐性检验后,方差齐时用 Scheffe 法,方差不齐时用 Games-Howell 法。

3 结果

3.1 小鼠一般情况的影响 试验后第 5~6 天,造

模小鼠出现腹泻、饮食减少、体毛无光泽、第 6~7 天出现不同程度的肉眼血便、蜷缩、活动减少、体重减轻。经供试品治疗 7 d 后,乌梅中、高剂量组无肉眼血便,可见松散大便。正常对照组小鼠一般性状无明显改变。

3.2 小鼠的疾病活动度评分 试验结果显示,乌梅低、中、高剂量组的 DAI 均降低,其中低剂量组与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$),中、高剂量组与模型组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),低剂量组与正常组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),中剂量组与正常组比较具有显著性差异($P < 0.05$),高剂量组与正常组比较无显著性差异。评分结果见表 2。

表 2 各组小鼠的疾病活动度评分($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	剂量 [g/(kg·d)]	评分
正常组	15	0	0
模型组	15	0	10.16 ± 0.36
低剂量组	15	2	7.86 ± 0.21 ¹⁾⁴⁾
中剂量组	15	4	3.35 ± 0.24 ²⁾³⁾
高剂量组	15	6	2.16 ± 0.17 ²⁾

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与正常组比较。

3.3 小鼠结肠黏膜损伤与评分 肉眼及光镜下观察模型组黏膜糜烂重,溃疡多而且大,黏膜严重充血、水肿;乌梅高剂量组黏膜糜烂不严重,溃疡小,黏膜充血、水肿程度轻;乌梅低剂量组黏膜糜烂较严重,溃疡仍较明显,黏膜充血、水肿程度亦可见及,无明显减轻;乌梅中剂量组的组织损伤介于高剂量组和低剂量组之间。正常组动物未见及黏膜充血、水肿和糜烂,黏膜光滑平整。评分结果见表 3。

表 3 肉眼及光镜下观察各组小鼠结肠黏膜损伤与评分的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	剂量 [g/(kg·d)]	肉眼评分	光镜下评分
正常组	15	0	0	0
模型组	15	0	7.98 ± 0.29	4.23 ± 0.24
低剂量组	15	2	5.98 ± 0.23 ¹⁾³⁾	4.13 ± 0.26 ³⁾
中剂量组	15	4	4.51 ± 0.23 ²⁾³⁾	2.19 ± 0.21 ¹⁾³⁾
高剂量组	15	6	1.16 ± 0.24 ²⁾	1.18 ± 0.12 ²⁾

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较; ³⁾ $P < 0.01$, 与正常组比较。

3.4 小鼠结肠组织 SOD 活力与 MAD 含量 试验结果显示,乌梅低、中、高剂量组的 SOD 活力值虽均低于正常组,但均高于模型组,其中低剂量组与

模型组比较无显著性差异,中、高剂量组与模型组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),低剂量组与正常组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),中剂量组与正常组比较具有显著性差异($P < 0.05$),高剂量组与正常组比较无显著性差异,结果见表 4。测得 MDA 含量中,乌梅低、中、高剂量组虽均高于正常组但均低于模型组,其中低剂量组与模型组比较无显著性差异,中、高剂量组与模型组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),低剂量组与正常组比较具有极显著性差异($P < 0.01$),中、高剂量组与正常组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。结果见表 4。

表 4 各组小鼠结肠组织 SOD 活力与 MAD 含量的改变($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	剂量 [g/(kg·d)]	SOD(U/g)	MDA(nmol/g)
正常组	15	0	22.65 ± 2.21	8.42 ± 1.52
模型组	15	0	11.03 ± 1.95	36.75 ± 2.02
低剂量组	15	2	12.25 ± 1.58 ³⁾	31.16 ± 2.61 ²⁾
中剂量组	15	4	18.28 ± 1.59 ¹⁾²⁾	15.84 ± 1.63 ¹⁾²⁾
高剂量组	15	6	19.32 ± 1.88 ¹⁾	16.25 ± 1.48 ¹⁾²⁾

¹⁾ $P < 0.01$, 模型组比较; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, 与正常组比较。

4 讨论

DSS 诱导的 UC 是一个重要模型, DSS 破坏肠黏膜屏障,使黏膜组织凝固坏死,增加 DSS 的通透性,促进 DSS 在结肠中扩散,加重炎症反应^[8]。该模型具有操作简单、重现性好、造型时间短等特点。因此比较适合该类药物的研究与筛选。溃疡性结肠炎(UC)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种, IBD 已被公认为是胃肠道中除恶变外最严重的疾病之一,流行病学实验表明,结肠癌的发生、发展与结肠炎症的反复发作密切相关,目前 UC 的病因与发病机制并不十分清楚。

近年来研究发现,炎症介质(白三烯、前列腺素等)在 UC 炎症反应中作用倍受重视,氧自由基(OFR)参与并且通过脂质过氧化反应产生这些物质。OFR 在 UC 的发病中起重要作用,细胞中的脂类物质受到 OFR 作用时,发生脂质过氧化反应,产生一些分解产物,如 MDA 等。MDA 为脂质过氧化的终末产物,其含量反映了组织中过氧化损伤程度。SOD 是重要的过氧化物歧化酶,能有效地清除氧自由基,从而抑制肠组织中的脂质过氧化反应,并能稳定细胞膜。SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,而 MAD 的高低又间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。本研究中,模型组小鼠的 DAI 评分和大体形态以及组织学评分均明显高于正常组,模型组小鼠结肠

中 SOD 活性显著低于正常组。模型组小鼠结肠中 MDA 含量显著高于正常组,这些反映了氧化应激过程。尤其是氧自由基诱发的脂质过氧化与溃疡性结肠炎有关^[9],可能是其发病机制之一。

本实验结果表明,自由基与 UC 的结肠组织损伤密切相关,参考 UC 的病理过程,用乌梅治疗后 UC 组织中的 MDA 含量降低,SOD 活性提高,疾病活动度降低,组织病理改变明显减轻,说明 UC 发病的自由基学说为减少 MDA 含量以及抗氧化治疗提供了理论依据,降低自由基水平可以为治疗溃疡性结肠炎提供新的途径。

【参考文献】

- [1] 丁伟群,林庚金. 溃疡性结肠炎发病中白介素水平的变化[J]. 复旦学报, 2001, 13(4): 61.
[2] 吴邱保. 加味乌梅丸与柳氮磺吡啶治疗慢性溃疡性结肠炎的

疗效比较[J]. 广东医学院学报, 2006, 24(5): 487.

- [3] 郭洪波,罗玉梅,王静波. 乌梅汤加减治疗溃疡性结肠炎 44 例[J]. 新中医, 2007, 39(1): 44.
[4] 董少群,李耀清. 乌梅丸加减治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎 64 例[J]. 河南医药信息, 2002, 10(17): 45.
[5] 王璐,张红宇,王莉. 乌梅及其炮制品大鼠长期毒性研究[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(10): 67.
[6] 易先国,李卫,吴海港,等. 香连汤对溃疡性结肠炎模型小鼠疗效试验[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(11): 28.
[7] 张涛,施斌,陈建永,等. 溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 CINC-1 及其受体 CXCR2 的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(1): 78.
[8] 刘颖,王莹. 甘草酸二铵抗大鼠溃疡性结肠炎作用及抗炎机制研究[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(14): 2027.
[9] 刘诗权,于皆平,冉宗学. 银杏叶萃取物抗肝纤维化作用的实验研究[J]. 中华临床医药, 2002, 3(11): 1.

[收稿日期]2012-01-17

[修回日期]2012-03-20

(上接第 335 页)

5 总结

天然植物中的萘醌类化合物具有广泛的抗微生物活性,这些化合物对细菌、真菌、病毒、寄生虫等都有一定的抑制作用。如今,随着这些致病微生物对合成抗生素的耐药性的不断增强,天然植物中提取出来的萘醌类化合物将有望进一步开发成潜在的抗微生物类药物。

【参考文献】

- [1] Tshibangu JN, Chifundera K, Kaminsky R, et al. Screening of African medicinal plants for antimicrobial and enzyme inhibitory activity[J]. J Ethnopharmacol, 2002, 80(1): 25.
[2] 宓伟,王志强,邱世翠,等. 紫草体外抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2217.
[3] Papageorgiou VP, Nicolaou KC, Assimopoulou AN, et al. The chemistry and biology of alkanin, shikonin, and related naphthazarin natural products[J]. Angew Chem Int Ed, 1999, 38: 270.
[4] Jeyachandran R, Mahesh A, Cindrella L, et al. Antibacterial activity of plumbagin and root extracts of plumbago zeylanica[J]. Acta Boil Cracoviensia Ser Botan, 2009, 51(1): 17.
[5] Bhuvanewari K, Gnana PS, Kuruvilla A, et al. Inhibitory concentrations of Lawsonia inermis dry powder for urinary pathogens

[J]. Indian J Pharmacol, 2002, 34: 260.

- [6] Sasaki K, Abe H, Yoshizaki F. *In Vitro* Antifungal Activity of Naphthoquinone Derivatives[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(5): 669.
[7] Tripathi RD, Srivastava HS, Dixit SN. A fungitoxic principle from the leaves of Lawsonia inermis Linn[J]. Experientia, 1978, 34(1): 51.
[8] Babu PD, Subhasree RS. Antimicrobial activities of Lawsonia inermis[J]. Acad J Plant Sci, 2009, 2(4): 231.
[9] 全炳武,李翔国,玄伟,等. 胡桃醌及其衍生物 5- β -二羟基-4-萘醌抑菌活性研究[J]. 植物保护学报, 2007, 33(2): 81.
[10] 赵辉. 白花丹治疗体、股癣 62 例[J]. 中医外治杂志, 2003, 12(3): 74.
[11] 罗学娅,李明辉,张宁,等. 左旋紫草素抗副流感病毒作用[J]. 中草药, 2005, 36(4): 568.
[12] Wendel, WB. The influence of naphthoquinones upon the respiratory and carbohydrate metabolism of malaria parasites[J]. Fed Proc, 1946, 5: 406.
[13] 韩建勇,曾鑫年,杜利香. 白花丹根提取物的杀螨活性[J]. 植物保护学报, 2004, 31(1): 85.
[14] Eyong KO, Folefoc GN, Kuete V, et al. Newbouldiaquinone A: Anaphthoquinon-anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from Newbouldia laevis[J]. Phytochemistry, 2006, 67(6): 605.

[收稿日期]2011-10-25

[修回日期]2011-12-23