

黎药益智仁不同极性部位提取物对实验性肠炎模型小鼠的影响[△]

房磊臣^{1,2*}, 刘 嫜¹, 高新征¹, 韦 祎¹, 刘一鸣¹, 黄 凌^{1#}(1.海南医学院药理教研室,海口 571101;2.北华大学附属医院生殖中心,吉林 吉林 132011)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2220-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.16

摘要 目的:考察黎药益智仁4种不同极性部位提取物对实验性肠炎模型小鼠的影响。方法:将益智仁70%乙醇提取物浸膏用水分散后,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇提取得相应部位提取物。将42只小鼠随机分为造模组(36只)和空白组(6只),造模组大鼠采用2,4,6-三硝基苯磺酸法复制实验性肠炎模型。成模后,将造模小鼠随机分为模型组、阳性组(柳氮磺胺吡啶肠溶片,52 g/kg)和益智仁不同极性部位(石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇部位)提取物组(剂量均为10 g/kg,以生药计),每组6只,ig给药,每天1次,连续9 d,给药体积为0.2 mL/10 g;空白组和模型组小鼠ig生理盐水。测定小鼠体质量变化,对疾病活动指数(DAI)进行评分,测定结肠组织中髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)活性,观察结肠组织病理变化并进行评分。结果:与空白组比较,模型组小鼠体质量下降百分率、DAI评分以及结肠组织中MPO、MDA活性均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结肠组织发生明显病变。与模型组比较,各给药组小鼠体质量显著回升,DAI评分显著降低, MPO活性显著降低,病理评分显著降低;阳性组、益智仁正丁醇提取物和乙酸乙酯提取物组小鼠结肠组织中SOD活性显著升高,阳性组和益智仁乙酸乙酯提取物组小鼠结肠组织中MDA活性显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:益智仁4种极性部位提取物对实验性肠炎模型小鼠均有一定改善作用,其中以乙酸乙酯部位和正丁醇部位效果较好。

关键词 益智仁;提取部位;实验性肠炎;小鼠

Effects of Extracts from Different Polar Parts of Li Medicine *Alpinia oxyphylla* Fruit on Model Mice with Experimental Colitis

FANG Leichen^{1,2}, LIU Qiang¹, GAO Xinzheng¹, WEI Yi¹, LIU Yiming¹, HUANG Ling¹(1.Teaching and Research Section of Pharmacology, Hainan Medical University, Haikou 571101, China; 2.Reproductive Center, the Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin Jilin 132011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of 4 polar parts extracts from Li medicine *Alpinia oxyphylla* fruit on model mice with experimental colitis, and screen the effective parts of *A. oxyphylla* fruit in the treatment of colitis. **METHODS:** After 70% ethanol extract dispersed by water, petroleum ether, trichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol were used in turn to obtain extractions in related parts. 42 mice were randomly divided into modeling group (36 mice) and blank group (6 mice). Mice in modeling group were taken 2, 4, 6-nitrobenzene sulfonic acid method to replicate the experiment colitis. After modeling, model mice were randomly divided into model group, positive group (Sulfasalazine enteric coated tablets, 52 g/kg), petroleum ether, trichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol extract from *A. oxyphylla* fruit groups (10 g/kg, calculated by crude drug), 6 in each group, intragastrically administrated once a day, for 9 d, 0.2 mL/10 g; mice in blank group and model group were intragastrically given normal saline. After administration, body mass of mice was determined, disease activity index (DAI) was scored and colonic myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) activities in colon tissue were detected, and the colon pathological changes were observed and scored. **RESULTS:** Compared with blank group, decrease percentage of body mass, DAI score, MPO and MDA activities in colon tissue in model group were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); colon tissue was pathologically changed. Compared with model group, body mass was increased, DAI score, MPO activity and pathological score in each administration groups were decreased; SOD activities in positive group, *n*-butanol extract from *A. oxyphylla* fruit group and ethyl acetate extract from *A. oxyphylla* fruit group were significantly increased, MDA activities in positive group and ethyl acetate extract from *A. oxyphylla* fruit group were significantly decreased, with statistical significances ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS:**

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81360586, 81473618);海南省自然科学基金资助项目(No.812186, 814290);海南省中药现代化专项项目(No.ZY201332);海口市重点科技计划项目(No.2013-50)

* 主治医师,博士。研究方向:泌尿生殖。电话:0432-69989888。E-mail:470048098@qq.com

通信作者:副教授,副研究员,硕士生导师,博士。研究方向:药动学、新药药理学。电话:0898-31350701。E-mail:puer6@163.com

The 4 polar parts extracts from *A. oxyphylla* fruit have certain improvement effects on model mice with experimental colitis, in which ethyl acetate and *n*-butanol parts are preferred.

KEYWORDS *Alpinia oxyphylla* fruit; Extraction parts; Experimental colitis; Mice

益智仁为姜科植物益智(*Alpinia oxyphylla* Miq.)的干燥成熟果实,主产于海南和广东,喜温暖、湿润气候,

多生长于林下阴湿处^[1]。海南产益智仁较其余产地益智仁质量更好,作为海南古老黎药方剂中的常用药材,是海南省著名的黎药资源^[2]。大量文献表明,益智仁不仅具有抗氧化应激、治疗阿尔茨海默病的作用^[3-6],而且对消化系统疾病(如腹泻等)也有一定的改善作用^[4,7]。炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)是一种反复发作的慢性非特异性肠道炎症性疾病,严重影响了人们的身体健康和生活质量,亟待发现安全有效的IBD治疗药物。在本研究中,笔者拟借助经典实验性肠炎模型,观察益智仁不同极性部位对实验性肠炎小鼠的影响,为该药的进一步研究及综合开发利用指出新的方向。

1 材料

1.1 仪器

722S型分光光度计(上海棱光仪器厂);JD5000-2型电子天平(天津市安特传感技术有限公司);LDZ5-2型快速离心机(北京芬格尔夫安科技有限责任公司)。

1.2 药材、药品与试剂

益智仁(海南省海口市市瑞堂医药公司,批号:20140520),经海南医学院王勇副研究员鉴定为真品;柳氮磺胺吡啶肠溶片(SASP,上海中西三维有限公司,批号:H31020450,规格:0.25 g/片);髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140728、20140531、20140910);正丁醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚(天津市富宇精细化工有限公司)。

1.3 动物

健康KM小鼠,SPF级,♂,体质量为15~22 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号:SCXK(湘)2009-0012。适应性饲养1周,无不良反应即进入实验。

2 方法

2.1 益智仁不同极性部位提取物的制备

取益智仁1.5 kg,粉碎,过一号筛,加70%乙醇9 L回流提取2次,每次1 h,纱布滤过,合并2次滤液,60℃以下减压蒸馏,得益智仁70%醇提物浸膏108 g。称取浸膏100 g,加水400 mL搅拌成乳浊液,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,得到相应萃取物,减压干燥后得到相应部位浸膏。取益智仁各部位浸膏各10 g,加入研钵中,分别往各研钵中慢慢滴加聚山梨酯80(加入量不超过5 mL)并研磨,直至浸膏乳化,再加入双蒸水补充体积至10 mL,继续研磨至乳浊液状态,得到1 g/mL的益智仁不同极性部位提取物药液。

2.2 造模

参照文献[8]中方法建立实验性肠炎小鼠模型。将42只小鼠随机分为造模组(36只)和空白组(6只),造模组小鼠禁食不禁水24 h,然后轻度乙醚麻醉,用直径为2 mm的橡胶软管插入肛门约4 cm,灌肠注入100 μL含

1.0 mg 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)的50%乙醇溶液,24 h后,灌肠注入含0.5 mg TNBS的50%乙醇溶液100 μL,单次操作在30 s内完成;导管保留在肠道几秒,然后轻轻取出,再倒立30 s,使药液达全结肠,然后将小鼠放回笼内饲养。空白组小鼠灌肠注入等体积生理盐水,其余操作相同。

2.3 给药

造模24 h后,将造模小鼠随机分为6组,每组6只,分别为模型组、阳性组(SASP,52 g/kg)和益智仁不同极性部位(石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇部位)提取物组[给药剂量以益智仁生药量计均为10 g/kg,经人临床用量的等效剂量换算而来]。ig给药,给药体积为0.2 mL/10 g,每天1次,连续9 d;空白组和模型组小鼠ig等体积生理盐水。

2.4 小鼠体质量测定

给药期间每天称定小鼠体质量1次,观察益智仁不同极性提取物对实验性肠炎模型小鼠体质量的影响,并计算给药第1、4、9天后小鼠体质量下降百分率 $[(W_n - W_1)/W_1 \times 100\%]$,其中 W_n 表示给药第 n 天小鼠的体质量, W_1 表示给药第1天小鼠的体质量]。

2.5 小鼠一般情况与疾病活动情况观察

给药后,每天观察小鼠便血情况、大便性状以及体质量丢失率,参考文献[9-10]中方法进行疾病活动指数(DAI)评分[DAI评分=(体质量丢失率评分+大便性状评分+便血情况评分)/3]。

2.6 小鼠结肠组织中MPO、SOD、MDA活性测定

末次给药2 h后处死小鼠,取一小段结肠组织,加入冰生理盐水,制成10%组织匀浆,按照相应试剂盒说明书操作,测定结肠组织中MPO、SOD、MDA活性。

2.7 小鼠结肠组织病理观察

取小鼠部分结肠组织,常规制作病理切片后以苏木精-伊红(HE)染色,镜下观察结肠黏膜损伤,根据文献[11]方法进行结肠组织学损伤评分,指标包括溃疡、炎症、肉芽肿及病变深度等。溃疡:无溃疡计0分,小溃疡(直径小于3 mm)计1分,大溃疡(直径大于3 mm)计2分;炎症:无炎症表现计0分,轻度炎症(高倍视野下白细胞浸润低于10%,无结构改变)计1分,中度炎症(高倍视野下白细胞浸润达10%~24%,黏膜层的腺管伸长、肠壁增厚,无溃疡)计2分,重度炎症(高倍视野下白细胞浸润达25%~50%,血管密度增高、肠壁增厚超出黏膜层)计3分,极重度炎症(高倍视野下显著的白细胞浸润达50%,高血管密度、腺管延长扭曲、杯状细胞丢失、透壁的肠壁增厚,伴随溃疡)计4分;肉芽肿:无计0分,有计1分;病变深度:至黏膜下层计0分,至肌层计1分,至浆膜层计2分。最后得分为各项指标的评分之和。

2.8 统计学方法

采用SPSS 17.0 统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐时采用单因素方差分析和 t 检验进行组间比较, 方差不齐时采用秩和检验; 病理组织学等级资料采用 Ridit 分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠体质量变化

给药第4天, 与空白组比较, 其余各组小鼠体质量均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益智仁不同极性部位提取物组小鼠体质量下降程度更高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 给药第9天, 与模型组比较, 各给药组小鼠体质量均明显回升 ($P < 0.05$), 结果详见表1。

表1 各组小鼠体质量下降百分率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Results of decrease percentage of body mass of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药前体质量, g	给药不同时间后体质量下降百分率, %		
		第1天	第4天	第9天
空白组	22.2 ± 1.04	0	2.10 ± 2.06	1.74 ± 1.34
模型组	22.5 ± 1.17	0	12.39 ± 5.98**	24.59 ± 5.33
阳性组	20.5 ± 1.22	0	9.16 ± 2.93**	4.45 ± 3.46#
益智仁石油醚提取物组	23.7 ± 1.07	0	17.69 ± 3.97**	11.04 ± 3.58#
益智仁三氯甲烷提取物组	21.4 ± 1.31	0	19.59 ± 5.56**	10.14 ± 1.76#
益智仁乙酸乙酯提取物组	21.6 ± 1.21	0	19.09 ± 2.16**	9.86 ± 1.17#
益智仁正丁醇提取物组	24.2 ± 1.02	0	18.60 ± 6.27**	9.46 ± 0.84#

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

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

3.2 小鼠DAI评分结果

给药第9天, 与空白组[DAI评分为(0.28 ± 0.14)分]比较, 模型组小鼠DAI评分[(2.89 ± 0.34)分]显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性组和益智仁石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇提取物组小鼠DAI评分[分别为(0.38 ± 0.14)、(0.72 ± 0.25)、(0.78 ± 0.17)、(0.83 ± 0.18)、(0.72 ± 0.14)分]均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.3 小鼠结肠组织中MPO、SOD、MDA活性测定结果

与空白组比较, 模型组小鼠结肠组织中MPO、MDA活性显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD活性显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组小鼠结肠组织中MPO活性、阳性组和益智仁乙酸乙酯提取物组小鼠结肠组织中MDA活性均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 阳性组、益智仁乙酸乙酯提取物组和益智仁正丁醇提取物组小鼠结肠组织中SOD活性显著升高 ($P < 0.05$), 结果详见表2。

3.4 小鼠结肠组织病理观察结果

与空白组(结肠组织病理损伤评分为0分)比较, 模型组小鼠结肠组织病理损伤评分[(9.16 ± 0.93)分]显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性组和益智仁石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇提取物组小鼠结肠组织病理损伤评分[分别为(1.78 ± 0.33)、(2.26 ± 0.33)、(1.96 ± 0.53)、(2.11 ± 0.14)分]均显著降低 ($P < 0.05$)。 病理切片图详见图1。

表2 各组小鼠结肠组织MPO、SOD、MDA活性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of MPO, SOD, MDA activities in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MPO, U/g	SOD, U/mL	MDA, nmol/mL
空白组	0.26 ± 0.21	25.26 ± 1.29	15.12 ± 1.33
模型组	2.76 ± 0.61*	8.76 ± 1.79*	45.56 ± 1.56**
阳性组	1.28 ± 0.53#	15.28 ± 0.83#	16.34 ± 1.03##
益智仁石油醚提取物组	1.97 ± 0.31#	18.97 ± 2.51	35.66 ± 2.53
益智仁三氯甲烷提取物组	1.99 ± 0.51#	19.49 ± 2.99	36.38 ± 2.34
益智仁乙酸乙酯提取物组	1.56 ± 0.13#	16.56 ± 2.58#	29.56 ± 1.09#
益智仁正丁醇提取物组	1.48 ± 0.43#	15.46 ± 2.16#	37.54 ± 2.45

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

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

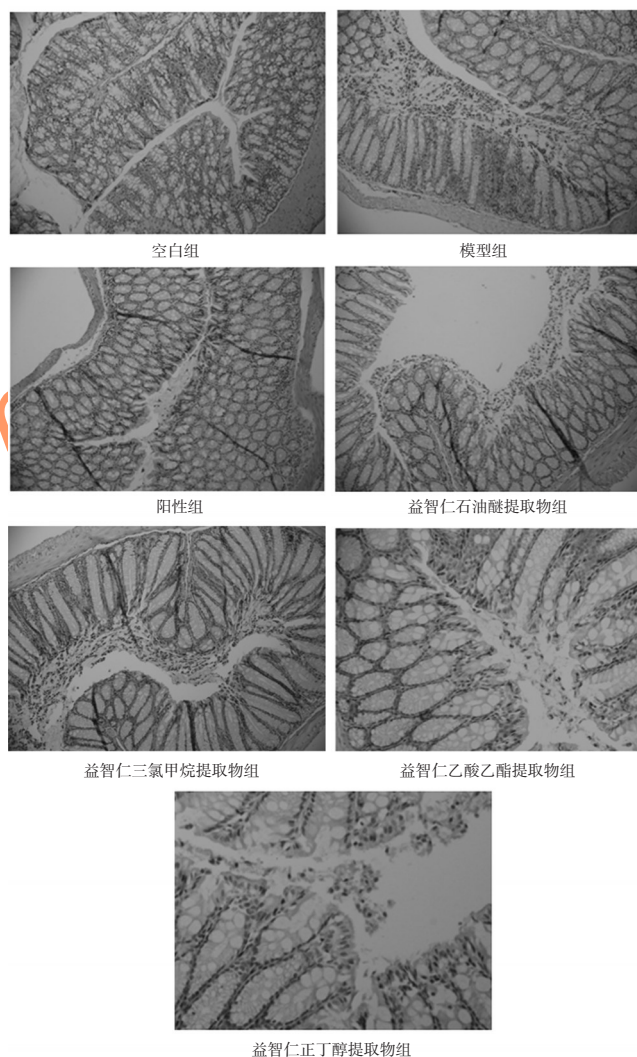


图1 各组小鼠结肠组织病理切片图(HE染色, ×200)
Fig 1 Pathological sections of colon tissue of mice in each group(HE staining, ×200)

4 讨论

TNBS 是一种弱有机酸, 能在乙醇灼伤结肠黏膜后与灼伤的结肠黏膜组织中大分子组织蛋白的赖氨酸ε-氨

基团结合成为一种全抗原物质,从而激发局部免疫反应、诱导肠炎的发生,且TNBS代谢产生的活性氧及过氧化物能对组织上皮细胞产生毒性而损伤肠壁组织。TNBS法造成的肠损伤与人类的炎症性肠病在发病机制、病理特点等方面相似,是现在常用的结肠炎动物模型造模法之一^[12]。本课题组采用TNBS造模后,发现小鼠出现结肠壁增厚、结肠透壁性坏死、肉芽肿等结肠炎典型特征,并且伴随着体质量的持续下降,这提示本研究中的炎症性结肠炎动物模型成功建立。SASP由于具有良好的抑制TNBS所致实验性肠炎的作用,而成为实验性肠炎研究中最常用的阳性药物^[13]。

本研究结果显示,益智仁不同极性部位提取物组小鼠的体质量都有明显回升,大便全部变为干燥状态,都由显性出血转变为不出血。病理实验结果表明,益智仁不同极性部位提取物组小鼠结肠组织糜烂、溃疡伴黏膜和黏膜下显著的炎症细胞浸润减轻。DAI综合评分结果显示,益智仁不同极性部位提取物组小鼠给药第9天的DAI评分均显著低于模型组,提示益智仁不同极性部位提取物对实验性肠炎均有较好改善作用。

MPO是中性粒细胞中含量较高的一种酶,可间接反映炎症在组织中的存在,可用来衡量组织炎症的程度。益智仁不同极性部位提取物均能显著降低实验性肠炎模型小鼠结肠组织中MPO活性,从而改善或减轻结肠炎症。SOD是存在于生物体内的一种抗氧化酶,能特异性地清除超氧阴离子,催化超氧化自由基分解成过氧化氢,进而在过氧化酶的作用下分解成水分子和氧分子^[14]。MDA是过氧化脂质的分解产物,可引起蛋白质变性和交联,使DNA损伤、酶及激素失活,损害细胞及细胞膜。在本研究结果中,模型组小鼠结肠组织中SOD活性显著降低,MDA活性显著升高,也进一步证明了小鼠实验性肠炎模型成功建立。当给予益智仁不同极性部位提取物后,发现益智仁乙酸乙酯提取物能显著升高结肠组织中SOD活性,并能显著降低结肠组织中MDA活性,这说明益智仁乙酸乙酯提取物能有效提高结肠组织对过氧化物的清除能力,减少过氧化脂质的产物生成。

综上所述,益智仁4种极性部位均具有一定改善实验性肠炎的作用,且以益智仁乙酸乙酯和正丁醇提取物作用较好,笔者推测其作用与降低肠炎组织氧化应激反应有关,但其作用机制及有效成分物质基础有待进一步研究。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海科技出

版社,1986:1957.

- [2] 刘民生. 黎药学概论[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:98.
- [3] 黄凌,朱毅,常艳波,等. 益智仁挥发油对帕金森病模型小鼠脑内纹状体和黑质损伤的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2009,23(3):176-182.
- [4] 王生,李永辉,徐鹏,等. 益智挥发油温脾止泻作用及其机制的初步研究[J]. 海南医学院学报,2013,19(4):433-438.
- [5] Liu A, Zhao X, Li H, *et al.* 5-Hydroxymethylfurfural, an antioxidant agent from *Alpinia oxyphylla* Miq. improves cognitive impairment in A β 1-42 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2):719-725.
- [6] Shi SH, Zhao X, Liu B, *et al.* The effects of sesquiterpenes-rich extract of *Alpinia oxyphylla* Miq. on amyloid- β -induced cognitive impairment and neuronal abnormalities in the cortex and hippocampus of mice[J]. *Oxid Med Cell Longe*, 2014, doi:10.1155/2014/451802.
- [7] Wang S, Zhao Y, Zhang J, *et al.* Antidiarrheal effect of *Alpinia oxyphylla*, Miq. (Zingiberaceae) in experimental mice and its possible mechanism of action[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168(2):182-190.
- [8] 李兴华. 益智仁温脾止泻作用及盐炙对其影响的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2009.
- [9] 景明,罗永皎,陈正君,等. 藏药湿生扁蕾对三硝基苯磺酸诱导的大鼠溃疡性结肠炎模型的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(2):351-354.
- [10] 张少卓,沈宇燕,田文全,等. 葶苈草颗粒对噁唑酮诱导的小鼠实验性肠炎的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(12):174-176.
- [11] 杨英. 己酮可可碱对实验性肠炎的治疗作用及对IL-23p19、IL-17A、NF- κ B的影响[D]. 苏州:苏州大学,2010.
- [12] 章莹,黄杰,肖榕,等. 三叶虫茶不同极性部位对溃疡性结肠炎模型大鼠的改善作用研究[J]. 中国药房,2016,27(25):3481-3484.
- [13] 袁学勤,王旭丹,谢鸣,等. 三硝基苯磺酸诱导Balb/c小鼠结肠炎的实验研究[J]. 中国药理学通报,2005,21(6):756-759.
- [14] 陈建国,邓虹珠. 苦豆子总碱对大鼠实验性结肠炎SOD,MDA,NO,MPO表达的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(4):323-325.

(收稿日期:2016-10-27 修回日期:2017-03-04)

(编辑:林静)