

膨润土对阿司匹林致小鼠胃黏膜损伤模型的保护作用

姜丰艳¹, 徐建国², 杨巧丽³, 王雪³, 王林林³, 姚华³, 黄华^{3*} (1.新疆医科大学, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆维吾尔自治区卫生厅, 乌鲁木齐 830001; 3.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

摘要: 目的 探讨膨润土对胃黏膜损伤的保护作用, 为开发该药物制剂奠定基础。方法 采用阿司匹林诱发小鼠胃黏膜损伤模型, 观察胃黏膜损伤程度并计算溃疡指数; 做胃组织病理学检查; 测定血清中丙二醛(MDA)的含量、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力; 并测定胃内容物 pH 值; 应用阿利斯蓝染色法测定胃壁结合黏液量。结果 通过病理检查和生化指标检测可知, 当膨润土的剂量为 50 mg·kg⁻¹ 时, 就可对模型小鼠的胃黏膜产生一定的保护作用, 当膨润土剂量达 200~300 mg·kg⁻¹ 时, 可明显改善胃黏膜损伤, 抑制胃黏膜 MDA 的生成, 恢复 SOD 和 GSH-Px 活性, 且可使胃黏膜的黏液量明显增加, 但对胃内容物的 pH 值无明显的影响。结论 膨润土剂量为 200~300 mg·kg⁻¹ 时, 对阿司匹林致小鼠胃黏膜损伤模型具有明显的保护作用。

关键词: 膨润土; 阿司匹林; 胃黏膜

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)08-0685-05

Protective Effect of Bentonite on Gastric Mucosal Injury Model Induced by Aspirin

JIANG Fengyan¹, XU Jianguo², YANG Qiaoli³, WANG Xue³, WANG Linlin³, YAO Hua³, HUANG Hua^{3*} (1.Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2.Xinjiang Uygur Autonomous Region Health Department, Urumqi 830001, China; 3.Pharmaceutical Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To research and assess bentonite on the protection of gastric mucosal injury to lay the foundation for the study of its pharmaceutical preparations. **METHODS** Gastric mucosal injury was induced by aspirin, and ulcer index was observed and calculated. Through gastric histopathology, gastric mucosal MDA content and SOD, GSH-Px activity in serum were measured. pH value of stomach contents was assayed. Gastric barrier mucus was quantitatively determined by means of Alcian blue to stain acidic mucus. **RESULTS** The pathological examination and biochemical tests presented that when bentonite dose was 50 mg·kg⁻¹, it had a protective effect on the gastric mucosa of the mice; when the bentonite dose was 200–300 mg·kg⁻¹, it could significantly improve gastric mucosal damage, inhibit MDA of gastric mucosal, restore the activity of SOD and GSH-Px, and significantly increase the gastric mucus content, but the pH value of stomach contents had no significant effect. **CONCLUSION** When the dose of bentonite is 200–300 mg·kg⁻¹, it has an obvious protective effect on gastric mucosal injury model induced by aspirin.

KEY WORDS: bentonite; aspirin; gastric mucous

膨润土又名斑脱岩、膨土岩, 是一种以蒙脱石为主要成分的细粒黏土, 还含有少量高岭石、水铝英石、绿泥石、蛋白石、云母等矿物质^[1]。按膨润土所含可交换阳离子种类、含量和结晶化学性质等, 可将膨润土划分为钠基膨润土、钙基膨润土和天然漂白土3种。由于膨润土具有吸水性、悬浮性、分散性、黏结性、触变性^[2], 使其具有乳化和增稠、助悬、吸附的功能, 是优良的药用辅料, 可广泛用于各种剂型。国外研究表明钠基膨

润土比钙基膨润土更适合药用^[3], 具有优越的崩解性能, 对神经、呼吸和心血管系统无毒副作用。钠基膨润土口服可作为消化道黏膜保护剂^[4], 其保护作用从食管至直肠, 包括整个消化道, 不影响正常的进食和排便, 而且本品不被血液吸收。据本课题组前期研究^[5], 将膨润土作为辅料加入阿司匹林片中, 可对抗阿司匹林致胃黏膜损伤的不良反应。本试验采用阿司匹林诱发小鼠胃黏膜损伤模型, 进一步考察钠基膨润土对胃黏膜的保护作

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技基础条件平台建设项目(PT1008)

作者简介: 姜丰艳, 女, 硕士生 Tel: 13999186815 E-mail: 421093336@qq.com *通信作者: 黄华, 女, 硕士, 研究员, 硕士 Tel: 13669961121 E-mail: huangh6505@163.com

用及适宜的剂量范围,为以后的药物制剂研究奠定基础。

1 材料

1.1 药物及试剂

钠基膨润土(南京威普物体工程研究所,批号:20090626-522-2),遮光、密封、室温干燥处保存;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,均由南京建成生物工程研究所提供;阿利新蓝(北京Blodex生物技术有限公司,批号:75881-23-1),实验时,取20 mg配制成100 mL,溶解过滤,滤液为浅蓝色溶液。

1.2 受试动物

昆明种小鼠,体质量18~22 g,清洁级,♀♂各半。由新疆医科大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:新医动字SYXK(新)2003-0001。

1.3 仪器

TG16B凯达离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);AL204电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);SP-752紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);WS2-261-79数显控温水温箱(上海苏进仪器设备厂)。

1.4 剂量设置依据

根据预实验得知,膨润土的剂量为50 mg·kg⁻¹,对胃黏膜有一定的保护作用;本实验时分6个膨润土给药剂量组,分别是50,100,150,200,250,300 mg·kg⁻¹。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法

取80只禁食24 h,不限水的健康小鼠,将小鼠称重后随机分组,每组10只,设正常对照组、阿司匹林组和膨润土的6个剂量组。首先,膨润土的6个剂量组按照“1.4”项下剂量灌胃给药1次;2 h后,除正常对照组外,其他各组均灌胃给予500 mg·kg⁻¹,每10 g灌胃0.1 mL的阿司匹林原料药造模。

2.2 测定指标

2.2.1 生化指标

2.2.1.1 MDA, SOD, GSH-Px测定 末次给药1 h后,摘眼球取血,注EP管中,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取血清,EP管分装,-20 ℃保存待测。测定MDA含量、GSH-Px、SOD活力按试剂盒说明书进行。

2.2.1.2 胃内容物pH值和胃壁结合黏液量测定^[6]

小鼠摘眼球取血后,断颈处死,剖腹取出胃,在胃贲门处剪一小口,小心挤出胃内容物,置于离心管中,3 500 r·min⁻¹离心15 min,取上清,加入9倍体积的双蒸水,用pH计测定其pH值。沿胃大弯将胃剪开,黏膜外翻,浸入阿利斯蓝染液20 mL,孵育(25 ℃,24 h),浸液离心(3 000 r·min⁻¹,20 min),取上清液测OD值。用分光光度计测定,以蒸馏水为空白管,阿利斯蓝染液为标准管,在615 nm处测各组的OD值。

2.2.2 病理指标 将每只鼠胃进行编号后由两位不知实验分组的观察者共同测定计算胃黏膜溃疡指数。按以下标准^[7]评分:充血红斑,糜烂,散见出血点,计为1分;直径<1 mm的小溃疡数目1~5个,计为2分;直径<1 mm的小溃疡数目多于1~5个,计为3分;1个直径>1 mm的明显溃疡,计为4分;穿孔性溃疡,计为5分。将每个胃所有溃疡的评分相加之和定为溃疡指数。

在胃腺近幽门1.0 cm处胃小弯侧取胃组织,石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察胃黏膜组织结构及细胞结构的变化并镜下摄片,按Lacy法^[7]进行黏膜损伤程度分级:0级为正常胃黏膜;I级为表层黏膜细胞内空泡形成,核浓染、可见少许表层细胞脱落;II级为损伤面积扩大,隐窝处亦见细胞脱落,但腺体完好;III级为黏膜损伤累及到腺体。

2.2.3 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用t检验。

3 结果

3.1 外观表现

小鼠造模后,出现活动减少、四肢无力、被毛蓬松等症状。

3.2 膨润土对MDA, SOD, GSH-Px的影响

当膨润土的剂量在200~300 mg·kg⁻¹时,可使胃黏膜的MDA含量下降,GSH-Px, SOD活性上升,且随剂量的增加,其作用越显著,与正常对照组和阿司匹林组比较,均有显著性差异。结果见表1。

3.3 膨润土对胃内容物pH值和胃壁结合黏液量的影响

与正常对照组相比,阿司匹林组的胃酸含量上升,但膨润土给药组与正常对照组相比,差异无统计学意义;膨润土的量在200~300 mg·kg⁻¹时,胃壁结合黏液量有所增加,与阿司匹林组和正常对照组比较有显著性差异。结果见表2。

表 1 膨润土对 MDA, SOD, GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Effects of bentonite on MDA, SOD, GSH-Px($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	膨润土剂量/mg·kg ⁻¹	阿司匹林剂量/mg·kg ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·L ⁻¹
正常对照组	0	0	6.12±0.59	168.52±39.84	139.91±30.5
阿司匹林组	0	500	9.09±1.7 ²⁾	119.61±37.88 ²⁾	107.16±37.23 ²⁾
膨润土 1 组	50	500	8.34±4.45	184.82±42.44	154.14±24.2
膨润土 2 组	100	500	7.58±3.47	198.16±12.73 ³⁾	194.22±87.53 ⁴⁾
膨润土 3 组	150	500	5.98±0.98 ⁴⁾	202.02±30.92 ¹⁾⁴⁾	202.93±70.85 ²⁾⁴⁾
膨润土 4 组	200	500	4.80±1.47 ¹⁾⁴⁾	204.04±18.79 ¹⁾⁴⁾	254.91±55.29 ²⁾⁴⁾
膨润土 5 组	250	500	4.34±0.93 ²⁾⁴⁾	212.19±23.33 ²⁾⁴⁾	268.28±35.62 ²⁾⁴⁾
膨润土 6 组	300	500	4.22±0.89 ²⁾⁴⁾	217.15±23.29 ¹⁾⁴⁾	288.19±27.95 ²⁾⁴⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与阿司匹林组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with aspirin group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

表 2 膨润土对胃内容物 pH 值和胃壁结合黏液的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 2 Effects of bentonite on the pH value of stomach contents and gastric barrier mucus($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	膨润土剂量/ mg·kg ⁻¹	阿司匹林 剂量/mg·kg ⁻¹	胃内容物 pH 值	胃壁结合 黏液量
正常对照组	0	0	3.11±0.22	0.38±0.14
阿司匹林组	0	500	2.69±0.41 ²⁾	0.19±0.10 ²⁾
膨润土 1 组	50	500	2.96±0.35	0.25±0.14
膨润土 2 组	100	500	3.00±0.37	0.32±0.05
膨润土 3 组	150	500	3.04±0.31	0.34±0.16
膨润土 4 组	200	500	3.13±0.3 ³⁾	0.46±0.13 ¹⁾⁴⁾
膨润土 5 组	250	500	3.27±0.26 ⁴⁾	0.55±0.16 ¹⁾⁴⁾
膨润土 6 组	300	500	3.23±0.31 ⁴⁾	0.59±0.07 ²⁾⁴⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与阿司匹林组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with aspirin group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

3.4 病理结果

3.4.1 胃黏膜溃疡指数计算 与阿司匹林组比较, 膨润土各剂量均能减轻阿司匹林致小鼠胃黏膜的损伤, 其中膨润土剂量在 200~300 mg·kg⁻¹ 时作用明显, 结果见表 3。

表 3 膨润土对各组胃黏膜溃疡指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 3 Effects of bentonite on gastric ulcer index of each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	膨润土剂量/ mg·kg ⁻¹	阿司匹林剂量/ mg·kg ⁻¹	溃疡指数
正常对照组	0	0	0.55±0.32
阿司匹林组	0	500	6.01±1.5
膨润土 1 组	50	500	5.12±1.21
膨润土 2 组	100	500	5.02±2.17
膨润土 3 组	150	500	4.96±1.89
膨润土 4 组	200	500	4.58±0.6 ¹⁾
膨润土 5 组	250	500	4.52±1.26 ¹⁾
膨润土 6 组	300	500	4.40±0.89 ¹⁾

注: 与阿司匹林组比较, ¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with aspirin group, ¹⁾ $P<0.01$

3.4.2 病理切片

正常对照组: 胃表面上皮排列整齐, 黏膜内腺体丰富, 结构完整, 间质未见血管充血、出血等病变; Lacy 法分级 0 级。阿司匹林组: 胃黏膜出现小血管充血、间质水肿出血; 黏膜上皮细胞变性、脱落、糜烂、小溃疡形成; Lacy 法分级 III 级。膨润土 1 组: 胃黏膜表面上皮细胞变性、脱落、糜烂及小溃疡形成; Lacy 法分级 III 级。膨润土 2 组: 胃黏膜表面上皮细胞变性、脱落、间质水肿, 可见小糜烂, 未见小溃疡; Lacy 法分级 II 级。膨润土 3 组: 胃黏膜表面上皮细胞变性、灶性脱落、可见小糜烂, 未见小溃疡; 间质灶性出血; Lacy 法分级 II 级。膨润土 4 组: 胃黏膜表面上皮细胞变性、小灶性脱落、偶见小糜烂, 未见小溃疡; 腺体结构完整; Lacy 法分级 I~II 级。膨润土 5 组: 胃黏膜表面上皮细胞变性、灶性脱落、未见糜烂及小溃疡; 腺体结构完整; Lacy 法分级 I 级。膨润土 6 组: 胃黏膜表面上皮细胞变性、灶性脱落、未见糜烂及小溃疡; 腺体结构完整; Lacy 法分级 I 级。结果见图 1。

4 讨论

阿司匹林是一种传统的解热镇痛药, 口服后到肠道迅速被吸收, 阿司匹林的主要不良反应是造成胃黏膜的损伤, 此不良反应可能是有部分阿司匹林颗粒粘附在胃黏膜上, 直接刺激胃黏膜, 引起黏膜糜烂、溃疡、出血, 严重的甚至导致胃穿孔。过去有学者认为小剂量给药可以减轻这种不良反应, 但近年来许多学者发现小剂量的阿司匹林也可造成胃黏膜损伤, 尤其是老年人由于代谢能力降低, 胃黏膜屏障功能减弱, 更易遭受损伤^[8]。目前认为阿司匹林引起胃黏膜损伤的机制可能是阿司匹林的脂溶性导致其在酸性环境下不能离子化而溶解于胃液, 穿透胃黏膜上皮细胞膜,

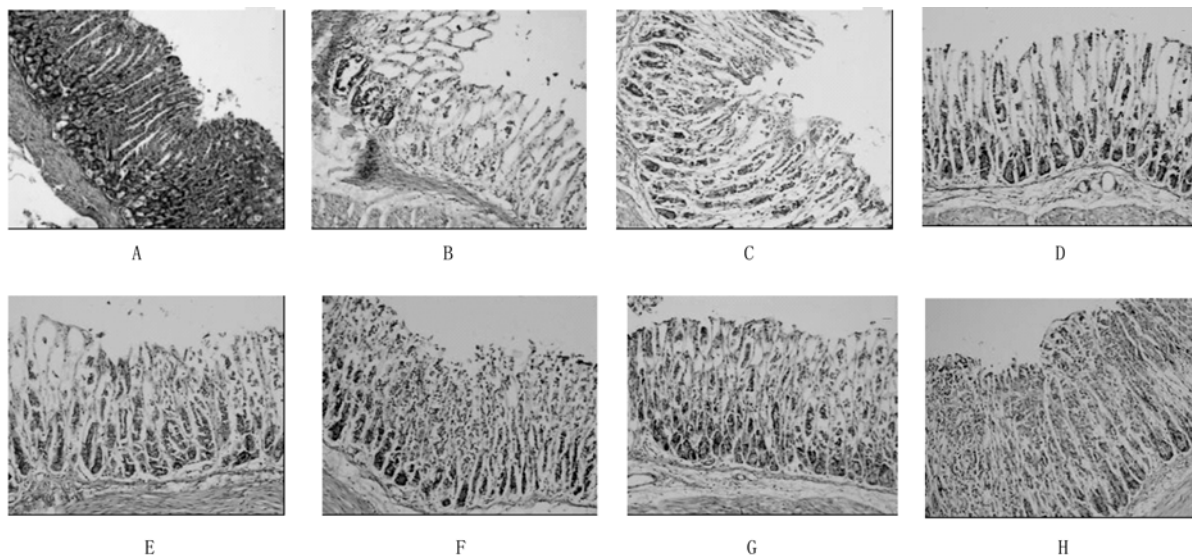


图1 小鼠胃黏膜病理切片(200×)

A-正常对照组; B-阿司匹林组; C-膨润土 1 组; D-膨润土 2 组; E-膨润土 3 组; F-膨润土 4 组; G-膨润土 5 组; H-膨润土 6 组

Fig 1 Gastric mucosal pathology(200×)

A-normal control group; B-aspirin group; C-bentonite group 1; D-bentonite group 2; E-bentonite group 3; F-bentonite group 4; G-bentonite group 5; H-bentonite group 6

破坏黏膜屏障;阿司匹林还可抑制 COX-1 活性,干扰花生四烯酸代谢,继而减少具有细胞保护作用的 PGI₂, PGE₁, PGE₂ 等的合成,导致黏液分泌减少,黏膜屏障受损, H⁺ 反渗入胃黏膜,胃酸增多,黏膜血流下降,细胞修复延迟,引起糜烂、溃疡和出血^[9]。

小鼠灌服 >200 mg·kg⁻¹ 的阿司匹林后,模型小鼠胃黏膜均呈明显损伤,主要表现为溃疡指数显著上升^[10]。本实验结果表明,通过溃疡指数和病理切片显示,与阿司匹林模型组相比,钠基膨润土在剂量为 200~300 mg·kg⁻¹ 时,溃疡指数明显降低,胃黏膜表面上皮细胞变性、灶性脱落、未见糜烂及小溃疡,腺体结构完整;Lacy 法分级 I 级。钠基膨润土剂量 <200 mg·kg⁻¹ 时,溃疡指数有一定程度的降低,但无显著性差异。胃黏膜表面上皮细胞变性、脱落、间质水肿,可见小糜烂,未见小溃疡;Lacy 法分级 II 级或 III 级。

MDA 是胃黏膜的攻击因子之一,它的含量反映机体脂质过氧化的速率及强度,可间接反映组织受自由基损伤的程度^[11]。SOD 是一种重要的抗氧化酶,可以清除超氧阴离子自由基,保护生物体免受自由基的攻击,对机体的氧化及抗氧化平衡起着至关重要的作用,因此, SOD 是胃黏膜的保护因子之一,其活力的高低间接反映机体清除自由基的能力^[12]。另胃黏膜富含的非蛋白巯基化

合物(NPSH)中 95%以上是谷胱甘肽(GSH)。GSH 是细胞的主要抗氧化剂,被视为主要的局部防御因子, GSH 本身可直接清除氧自由基,与 GSH-Px 和谷胱甘肽还原酶(GSH-R)共同组成 GSH-Px 氧自由基清除系统。其在清除 H₂O₂、防止生成更大毒性的羟自由基的反应中起关键作用,从而达到保护胃黏膜作用^[13]。SOD, MDA 和 GSH-Px 可间接反应自由基代谢水平。当胃黏膜损伤时,表现为 SOD 的活性降低, MDA 的含量升高, GSH-Px 的活性降低。本实验结果显示,与阿司匹林模型组相比,钠基膨润土在剂量为 200~300 mg·kg⁻¹ 时能够明显的抑制 MDA 的生成,恢复 SOD, GSH-Px 活性,从而消除氧自由基,消减过量的超氧阴离子对胃黏膜的损伤,即使在膨润土的剂量 <200 mg·kg⁻¹ 时,也可以显示出这一功效。提示膨润土可通过提高机体抗氧化和清除自由基的能力,抑制脂质过氧化反应,改善自由基代谢,能有效地改善阿司匹林诱发小鼠胃黏膜损伤。

此外,胃黏膜的壁细胞和主细胞不断向胃腔内分泌 H⁺ 和胃蛋白酶,胃酸和胃蛋白酶这种特定的配合,可以促进食物的消化吸收,但同时又成为胃黏膜组织生理性的攻击因素^[14]。胃壁结合黏液可形成黏膜屏障,从而对胃黏膜具有保护作用,本试验结果显示,与阿司匹林模型组相比,钠基膨润土在剂量为 200~300 mg·kg⁻¹ 时,胃壁结合黏

液量明显的增加,但与正常对照组相比,胃内容物 pH 值无差异。提示钠基膨润土可以使机体胃壁结合黏液增加,发挥胃黏膜保护作用,但对胃酸的分泌无明显的影响。

通过本试验的研究,确定了膨润土对胃黏膜保护作用的适宜剂量范围,可扩大膨润土在药用辅料方面的应用价值,也为探索新的药物制剂奠定基础。

REFERENCES

- [1] MADKOUR A A, MADINA E M, EL-AZZOUNI O E, et al. Smectite in acute diarrhea in children: adouble blindplacebo-controlledclinical trial [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1993, 17(2): 176-181.
- [2] GUI F T, CHEN Q, HOU H S. Study on new technology of high purity sodium base bentonite preparation [J]. Non-metallic Mines(非金属矿), 1999, 22(4): 36-37.
- [3] HAN X S. Comprehensive development and utilization of bentonite [J]. Inorg Silicon & Alumium Compound(硅铝化合物), 2004, 129(4): 1-11.
- [4] YANG J. Develop montmorillonite's medical applications [J]. Shanghai Pharm Intel Res(上海医药情报研究), 1998, 4(51): 11-12.
- [5] MA X, XU J G, XUE G P. Compare with the performance of Sodium base bentonite and some commonly used disintegrating agent [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med Pharm(新疆中医药), 2009, 27(3): 13-15.
- [6] COME S J, MORRISSEY S M, WOODS R J. A method for the quantitative estimation of gastric mucosal barrier [J]. Physiology, 1974, 242(2): 116-117.
- [7] GUTH P H, AURES D, PAUSLSEN G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat [J]. Gastroenterology, 1979, 76(1): 88-93.
- [8] ZHANG J, FEI J X. Low-dose aspirin on gastroduodenal mucosal injury [J]. Chin J Curr Pract Med(中国现代实用医学杂志), 2007, 6(3): 33-41.
- [9] AWTRY E H, LOSCALZO J. Aspirin [J]. Circulation, 2000, 101(10): 1206-1218.
- [10] ZHOU G X, GAO C, XU P, et al. Animal Model of Human Disease Methodology(人类疾病动物模型复制方法学) [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 2008: 68.
- [11] HUA R, WALZ W. Minocycline treatment prevents cavitation in rats after a cortical devascularizing lesion [J]. Brain Res, 2006, 1090(1): 172-181.
- [12] SU J Y. Pathophysiology(病理生理学) [M]. Beijing: Beijing Medical University, Peking Union Medical University Joint Publishing House, 1997: 135.
- [13] TAN M H, WANG H J. Protection of sulfhydryl on low dose aspirin-induced gastric mucosal lesions in rats [J]. Chin J Gastroenterol(胃肠病学), 2008, 13(3): 174-178.
- [14] MA J M, TANG L F, XU X, et al. Astragalus decoction on the mechanism of gastric mucosal injury in progress [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2008, 17(13): 2093-2095.

收稿日期: 2010-09-28