

## 二氢杨梅素对大鼠免疫性慢性胃炎胃黏膜的保护作用及其机制

陈立峰\*, 张琼, 董倩倩

(湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南长沙 410013)

**摘要:** **目的** 研究二氢杨梅素(DMY)对免疫性慢性胃炎大鼠胃黏膜的保护作用及其作用机制,为DMY用于防治慢性胃炎提供实验依据。**方法** 皮下注射给予SD大鼠同种异体胃黏膜匀浆与弗氏完全佐剂制成的免疫抗原,每15 d免疫1次,共3次,制备免疫性慢性胃炎模型。第2次免疫注射的同时,正常对照组和模型组ig给予蒸馏水,给药组ig给予DMY(50, 100和200 mg·kg<sup>-1</sup>)或瑞巴派特(27 mg·kg<sup>-1</sup>),每天1次,共30 d。末次给药后第2天,处死大鼠,采用酸碱滴定法测定胃游离酸(FA)和总酸(TA)含量,阿尔新蓝法测定胃游离黏液量,放射免疫法测定血清胃泌素(GAS)和血浆胃动素(MOT)水平,比色法测定血清总超氧化物歧化酶(SOD)、铜-锌-SOD(Cu-Zn-SOD)、锰-SOD(Mn-SOD)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性及丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)含量,ELISA法测定血清白细胞介素2(IL-2), IL-4和免疫球蛋白G(IgG)水平,并取胃黏膜做组织病理学检查。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠除血浆MOT水平无明显变化外,其他检测指标均出现病理性变化。DMY对模型组病理性变化均有明显改善作用,可增加胃酸的分泌,减少胃液中游离黏液量,降低血清GAS水平,但对血浆MOT无明显影响;大鼠胃黏膜病理改变明显减轻,炎症细胞浸润明显减少,炎症评分明显下降;提高总SOD, Cu-Zn-SOD和Mn-SOD活性,抑制MDA的生成,降低iNOS活性,减少NO生成;降低血清IL-4和IgG水平,升高IL-2水平。**结论** DMY对免疫性慢性胃炎大鼠胃黏膜具有明显的保护作用,该作用机制可能为调节机体免疫功能,抑制胃黏膜的自身免疫作用;增强氧自由基清除酶系统和降

低NO生成酶系统的活性,抑制体内脂质过氧化物的生成。

**关键词:** 二氢杨梅素; 胃炎; 胃黏膜; 免疫

**中图分类号:** R285, R975

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3002(2009)05-0381-07

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.05.008

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)具有抗氧化损伤、抗菌消炎和抑制肿瘤细胞生长等作用<sup>[1]</sup>,同时可调节机体的免疫功能<sup>[2]</sup>,对自身免疫反应导致的口腔黏膜损伤和炎症反应均具有明显的抑制作用<sup>[3]</sup>。据报道,幽门螺杆菌等可引起慢性胃炎,其发生发展与免疫功能紊乱密切相关<sup>[4]</sup>,特别是萎缩性胃炎患者存在体液免疫和细胞免疫异常<sup>[5]</sup>。用同种异体胃黏膜免疫大鼠可诱发胃黏膜炎症细胞浸润和萎缩性病变<sup>[6]</sup>。因此,本研究制备免疫性慢性胃炎大鼠模型,观察DMY对免疫性慢性胃炎胃黏膜的保护作用及其机制,为DMY用于防治慢性胃炎提供实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物、药物和试剂

SPF级SD大鼠,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0002。DMY从显齿蛇葡萄[*Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz.) W. T. Wang]干燥嫩茎叶中提取,HLPC法测定其纯度为97.6%,由湖南省中医药研究院中药研究所制剂实验室提供,批号为20060412,临用前用蒸馏水分别配制成5, 10和20 g·L<sup>-1</sup>的悬液。瑞巴派特(rebamipide)为浙江省大冢制药有限公司产品,批号为060301,临用前研碎用蒸馏水配制成浓度为2.7 g·L<sup>-1</sup>的悬液。磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4, 147.5 mmol·L<sup>-1</sup>)由KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液(150 mmol·L<sup>-1</sup>) 96 mL, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液(150 mmol·L<sup>-1</sup>) 404 mL和

收稿日期: 2009-02-07 接受日期: 2009-05-26

基金项目: 湖南省科技基金资助项目(04SK3067)

作者简介: 陈立峰(1950-),男,湖南省华容人,研究员,主要从事药理学与毒理学研究。

\*联系作者 E-mail: chenlifg@163.com Tel(Fax): (731)88905422

NaCl 溶液( $145 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 500 mL 混合,加入硫柳汞钠 0.2 g 即得。弗氏完全佐剂为美国 Sigma 公司产品;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、铜-锌-SOD(Cu-Zn-SOD)、锰-SOD(Mn-SOD)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)和一氧化氮(nitric oxide, NO)含量测定试剂盒,南京建成生物工程研究所产品;白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2), IL-4 和免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)浓度测定试剂盒为美国 Rapid BioLab 公司产品;血清胃泌素(gastrin)测定试剂盒为北京北方生物技术研究所产品;血浆胃动素(motilin)测定试剂盒为北京科美东雅生物技术有限公司产品。

### 1.2 抗原的制备

SD 大鼠 36 只,体重 200 ~ 250 g,雌雄各半,ip 给予戊巴比妥钠  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  麻醉,剖腹取胃,用生理盐水洗净胃内容物,无菌条件下分离胃黏膜,称重,置匀浆管内,加入 PBS,在冰水浴中用 DY89-II 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)制成 10% 匀浆, $4^{\circ}\text{C}$   $430 \times g$  离心 15 min,取上清液,考马斯亮蓝法测蛋白质浓度,用 PBS 调整蛋白质浓度为  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,得黏膜匀浆,分装至灭菌小瓶中, $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。每次取黏膜匀浆 32.0 mL,加弗氏完全佐剂 32.0 mL,用双注射器对抽法乳化,至乳化剂滴入水中不分散,得免疫抗原;另取 PBS 和弗氏完全佐剂各 7.0 mL,同法乳化作为正常对照组,模型组,DMY 3 个剂量组及瑞巴派特组对照乳剂。

### 1.3 免疫性慢性胃炎大鼠模型的制备和给药

取 SD 大鼠 60 只,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半,按性别和体重分层随机分为正常对照组,模型组,DMY 3 个剂量组及瑞巴派特组。参照文献[6]方法,于大鼠左右腹股沟和背部皮下,75% 乙醇消毒,模型组和给药组大鼠 sc 免疫抗原,每个部位 0.4 mL;正常对照组大鼠 sc 对照乳剂替换免疫抗原。每 15 d 免疫 1 次,共 3 次。第 2 次免疫注射同时,正常对照组和模型组大鼠 ig 给予蒸馏水,其他组分别 ig 给予 DMY 50, 100 和  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  或瑞巴派特  $27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,给药体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,共给药 30 d。末次给药后次日(禁水不禁食),ip 戊巴比妥钠  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  麻醉,后腔静脉取血 2 mL,置含 10% EDTA-2Na 溶液 30  $\mu\text{L}$  的抗凝管中;另取血 3 mL,置普通试管中,室温下放置 30 min,于  $0^{\circ}\text{C}$  下  $970 \times g$

离心 10 min;分别分离血浆与血清,用 0.5 mL 锥形试管分装后,置  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。同时分离出胃,用丝线分别结扎贲门和幽门,自离胃端剪断食管和十二指肠,取胃,用 5 mL 生理盐水冲洗表面血迹,滤纸吸干水分,置直径 90 mm 培养皿中,沿胃大弯剪开,用 5 mL 中性蒸馏水冲洗胃内容物,收集冲洗液置 5 mL 离心管中, $970 \times g$  离心 10 min,取胃液上清液。

### 1.4 胃功能指标的测定

取胃液上清液 1.0 mL,按酸碱滴定法<sup>[7]</sup>用 NaOH  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液滴定,以酚酞和对二甲苯偶氮苯胺为指示剂分别指示终点,记录 NaOH 溶液消耗量,计算胃游离酸(free acid, FA)和总酸(total acid, TA)含量。参照文献[8]取胃液上清液 1.0 mL,加 1% 阿尔新蓝溶液 1.0 mL,用 S22PC 型可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)于 615 nm 测定吸光度(A)值,计算胃游离黏液量。

### 1.5 胃黏膜病理学形态观察

肉眼观察胃黏膜形态,然后取腺胃,4% 甲醛固定,石蜡包埋,常规切片,HE 染色,显微镜下观察。炎症反应采用分级记分<sup>[9]</sup>。0 分:无炎症;1 分:在胃黏膜上皮内(胃小凹区)或固有腺底部可见多个慢性炎症细胞;2 分:在胃黏膜小凹区至黏膜肌层均有较多的炎症细胞浸润;3 分:在胃黏膜内可见成堆炎症细胞聚集灶。

### 1.6 血清胃泌素和血浆胃动素水平的测定

将冻存血清缓慢复温至融化状态,按试剂盒说明采用放射免疫法用 SN-695B 型智能化放免  $\gamma$  测量仪(上海原子核研究室日环仪器一厂)测定血清胃泌素和血浆胃动素的含量。

### 1.7 血清 SOD, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD 和 iNOS 活性及 MDA 和 NO 含量的测定

将冻存血清缓慢复温至融化状态,按试剂盒说明采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD, Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性,采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,采用比色法测定 iNOS 活性和 NO 含量。

### 1.8 血清 IgG, IL-2 和 IL-4 水平的测定

将冻存血清缓慢复温至融化状态,按 ELISA 试剂盒说明书进行,用 4MK2 型洗板机洗板, MK3 型酶标仪测定。

### 1.9 统计学分析

结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用单因素方差分析,  $q$  检验判断组间差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 DMY 对大鼠胃液总酸、游离酸及游离黏液量的影响

与对照组比较,模型组大鼠胃液中 TA 和 FA 含量明显降低,胃游离黏液增多。与模型组比较,DMY 50 mg·kg<sup>-1</sup>明显减少胃游离黏液量;DMY 100 和 200 mg·kg<sup>-1</sup>明显升高胃 TA 和 FA 含量,减少胃游离黏液含量。瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup>明显升高胃 TA 和 FA 含量,但不影响胃游离黏液含量(表 1)。

**Tab 1. Effect of dihydromyricetin (DMY) on levels of total acids, free acids and free mucus in gastric juice of autoimmune chronic gastritis rats**

Group	Dose/ mg·kg <sup>-1</sup>	Total acid/ mmol·L <sup>-1</sup>	Free acid/ mmol·L <sup>-1</sup>	Free mucus/ g·L <sup>-1</sup>
Normal control		6.6 ± 1.6	4.2 ± 1.6	0.25 ± 0.08
Model		4.4 ± 0.6 <sup>**</sup>	2.1 ± 0.7 <sup>**</sup>	0.40 ± 0.05 <sup>**</sup>
DMY	50	5.0 ± 1.1	2.5 ± 0.8	0.32 ± 0.08 <sup>#</sup>
	100	5.9 ± 1.4 <sup>#</sup>	3.2 ± 0.6 <sup>#</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>##</sup>
	200	6.1 ± 1.1 <sup>#</sup>	3.5 ± 1.1 <sup>#</sup>	0.24 ± 0.05 <sup>##</sup>
Rebamipide	27	6.0 ± 0.8 <sup>#</sup>	3.4 ± 0.8 <sup>#</sup>	0.37 ± 0.05

The supernatant of homogeneous gastric mucosa from SD rats was emulsified and Freund's complete adjuvant (FCA) was subcutaneously injected into rat back and both sides of inguinals once 15 d for 3 times to establish rat autoimmune chronic gastritis model, and only FCA injected as normal control. At the same time of the second immunogen injection, the drug treatments (ig) were administered once daily for 30 d. Water was used instead of drugs in normal and model control groups. The levels of total acids and free acids were measured by acid-base titration and free mucus was measured by alcian blue assay in gastric juice on the day after the last drug administration.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with normal control group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with model group.

### 2.2 DMY 对大鼠血清胃泌素和血浆胃动素水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清胃泌素水平明显升高,血浆胃动素水平无明显变化。与模型组比较,DMY 200 mg·kg<sup>-1</sup>和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup>均显著降低血清胃泌素水平,但不影响血浆胃动素水平(表 2)。

### 2.3 DMY 对大鼠胃黏膜形态和组织病理变化的影响

肉眼观察,对照组胃黏膜色泽淡红,表面光滑有弹性,可见被覆的黏液无颗粒感,黏膜皱襞完整。模型组大鼠胃黏膜颜色较浅或暗红色,有广泛的陈旧性出血点,有白色颗粒状的瘢痕组织,表面缺乏光泽,有的大鼠胃黏膜表面有苔状分泌物,去除苔状分

**Tab 2. Effect of dihydromyricetin on level of serum gastrin and plasma motilin of autoimmune chronic gastritis rats**

Group	Dose/ mg·kg <sup>-1</sup>	Gastrin/ mg·L <sup>-1</sup>	Motilin/ mg·L <sup>-1</sup>
Normal control		31 ± 11	240 ± 29
Model		52 ± 10 <sup>**</sup>	237 ± 43
DMY	50	50 ± 6	229 ± 26
	100	42 ± 11	245 ± 31
	200	39 ± 12 <sup>#</sup>	254 ± 44
Rebamipide	27	40 ± 11 <sup>#</sup>	252 ± 57

See Tab 1 for the treatments. The levels of gastrin and motilin were determined by radioimmunoassay.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with normal control group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared with model group.

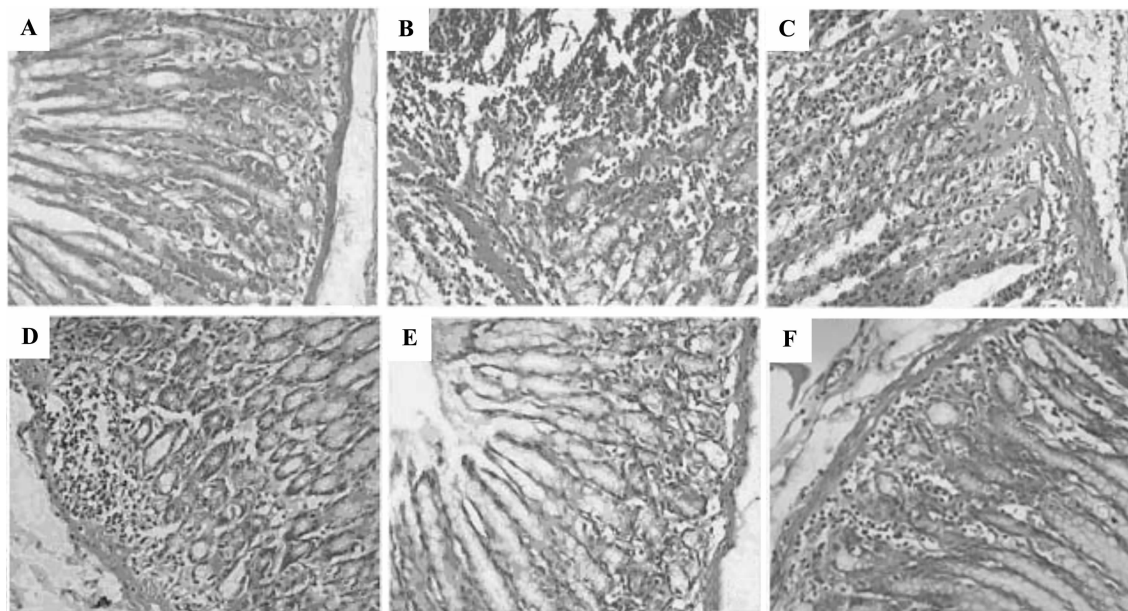
泌物后,可见黏膜下血管,黏膜皱襞较平或消失。DMY 和瑞巴派特组胃黏膜淡红色,表面苔状物较少,未见黏膜下血管暴露,可见黏膜皱襞。

显微镜下检查,对照组大鼠胃黏膜上皮细胞排列整齐,无缺损或脱落,腺体形状规则,大小基本一致,固有层内可见散在少量炎症细胞,炎症评分为 0.3 ± 0.5。模型组大鼠胃黏膜上皮结构紊乱,黏膜固有层成堆炎症细胞浸润,炎症评分比对照组显著增加,达 2.5 ± 0.8。DMY 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup>和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup>能明显减轻大鼠胃黏膜炎症评分,胃黏膜上皮细胞尚清晰,黏膜内可见少量炎症细胞浸润;DMY 50 mg·kg<sup>-1</sup>对胃黏膜炎症反应无明显影响(表 3,图 1)。

**Tab 3. Effect of dihydromyricetin on scores of inflammation of gastric mucosa of autoimmune chronic gastritis rats**

Group	Dose/mg·kg <sup>-1</sup>	Score of inflammation
Normal control		0.3 ± 0.5
Model		2.5 ± 0.8 <sup>**</sup>
DMY	50	2.2 ± 0.8
	100	1.4 ± 1.0 <sup>#</sup>
	200	1.2 ± 0.9 <sup>##</sup>
Rebamipide	27	1.3 ± 0.9 <sup>#</sup>

See Tab 1 for the treatments. Score 0: no inflammatory reaction; score 1: a number of inflammatory cells infiltration in gastric intraepithelial (gastric pit area) or fundal glands propria; score 2: many inflammatory cells infiltration in gastric pit area and gastric muscularis; score 3: the foci of numerous inflammatory cells together in gastric mucous.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with normal control group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with model group.



**Fig 1. Effect of dihydromyricetin on histopathological changes in gastric mucosa of autoimmune chronic gastritis rats (HE staining, ×400).** See Tab 1 for the treatments. A: normal control; B: model; C, D and E: DMY 50, 100 and 200 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively; F: rebamipide 27 mg·kg<sup>-1</sup>.

**2.4 DMY 对大鼠血清总 SOD, Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性及 MDA 含量的影响**

与对照组比较,模型组大鼠血清总 SOD, Cu-Zu-SOD 和 Mn-SOD 活性明显降低,MDA 水平明显升高。与模型组比较,DMY 100,200 mg·kg<sup>-1</sup>和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup>均明显升高血清总 SOD 和 Cu-Zu-SOD活性,明显降低血清 MDA 水平。DMY

200 mg·kg<sup>-1</sup>明显提高血清 Mn-SOD 活性(表 4)。

**2.5 DMY 对大鼠血清 iNOS 活性和 NO 水平的影响**

与对照组比较,模型组大鼠血清 iNOS 活性和 NO 水平明显升高。与模型组比较,DMY 200 mg·kg<sup>-1</sup>和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup>均显著降低血清 iNOS 活性和血清 NO 水平,而 DMY 50 和 100 mg·kg<sup>-1</sup>无明显作用(表 5)。

**Tab 4. Effect of dihydromyricetin on activities of total superoxide dismutase (SOD), Cu-Zn-SOD and Mn-SOD and content of malondialdehyde (MDA) in serum of autoimmune chronic gastritis rats**

Group	Dose/ mg·kg <sup>-1</sup>	Total SOD/ kU·L <sup>-1</sup>	Cu-Zn-SOD/ kU·L <sup>-1</sup>	Mn-SOD/ kU·L <sup>-1</sup>	MDA/ nmol·L <sup>-1</sup>
Normal control		320 ± 7	294 ± 8	27 ± 14	2.8 ± 0.8
Model		275 ± 8 **	263 ± 12 **	12 ± 6 *	4.4 ± 0.8 **
DMY	50	280 ± 6	264 ± 8	16 ± 6	3.8 ± 0.8
	100	301 ± 14 <sup>###</sup>	283 ± 13 <sup>###</sup>	19 ± 10	3.0 ± 0.6 <sup>###</sup>
	200	311 ± 8 <sup>##</sup>	284 ± 9 <sup>##</sup>	26 ± 10 <sup>#</sup>	2.6 ± 0.6 <sup>##</sup>
Rebamipide	27	304 ± 10 <sup>###</sup>	283 ± 10 <sup>###</sup>	21 ± 9	3.1 ± 1.1 <sup>##</sup>

See Tab 1 for the treatments. The total SOD, Cu-Zu-SOD, Mn-SOD activities and malondialdehyde level were determined by spectrophotometry.  $\bar{x} \pm s$ , n = 10. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with normal control group; # P < 0.05, ### P < 0.01, compared with model group.

**Tab 5. Effect of DMY on activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and content of nitric oxide (NO) in serum of autoimmune chronic gastritis rats**

Group	Dose/ mg·kg <sup>-1</sup>	iNOS/ kU·L <sup>-1</sup>	NO/ μmol·L <sup>-1</sup>
Normal control		3.3 ± 1.0	55 ± 12
Model		6.6 ± 1.3 <sup>**</sup>	76 ± 16 <sup>**</sup>
DMY	50	6.4 ± 1.5	70 ± 13
	100	5.4 ± 1.5	68 ± 10
	200	3.6 ± 1.3 <sup>##</sup>	55 ± 12 <sup>##</sup>
Rebamipide	27	4.5 ± 1.2 <sup>##</sup>	59 ± 14 <sup>#</sup>

See Tab 1 for the treatments. The iNOS activity and NO level were determined by spectrophotometry.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with normal control group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with model group.

## 2.6 DMY 对大鼠血清 IgG, IL-2 和 IL-4 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清中 IgG 和 IL-4 水平明显升高,IL-2 水平明显降低。与模型组比较,DMY 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup> 和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup> 均显著降低血清 IgG 水平。DMY 200 mg·kg<sup>-1</sup> 和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup> 显著降低 IL-4 水平,升高 IL-2 水平(表 6)。

**Tab 6. Effect of DMY on levels of serum immunoglobulin G (IgG), interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in serum of autoimmune chronic gastritis rats**

Group	Dose/ mg·kg <sup>-1</sup>	IgG/ nmol·L <sup>-1</sup>	IL-2/ μg·L <sup>-1</sup>	IL-4/ μg·L <sup>-1</sup>
Normal control		167 ± 27	240 ± 32	69 ± 18
Model		203 ± 18 <sup>*</sup>	150 ± 29 <sup>**</sup>	116 ± 12 <sup>**</sup>
DMY	50	192 ± 32	155 ± 20	115 ± 15
	100	172 ± 17 <sup>#</sup>	170 ± 17	101 ± 21
	200	139 ± 19 <sup>##</sup>	218 ± 23 <sup>##</sup>	80 ± 13 <sup>##</sup>
Rebamipide	27	161 ± 33 <sup>##</sup>	193 ± 26 <sup>##</sup>	91 ± 16 <sup>##</sup>

See Tab 1 for the treatments. The levels of IL-2, IL-4 and IgG were assayed with ELISA.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with normal control group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with model group.

## 3 讨论

本研究采用同种异体大鼠胃黏膜作为抗原多次免疫注射后,大鼠血清中胃泌素水平和胃游离黏液明显升高,胃 FA 和 TA 含量明显减少,胃黏膜出现

明显炎症反应,黏膜上皮结构紊乱,固有层成堆炎症细胞浸润,表现为慢性胃炎的特点。根据文献报道推测,由于抗胃黏膜抗体可激活补体系统,诱导炎症细胞在感染部位聚集,调理吞噬和刺激炎症细胞释放炎症介质及活性氧等物质损害胃上皮细胞,引起胃黏膜炎症反应,从而产生免疫损伤作用<sup>[10]</sup>。同时免疫系统在识别外来抗原时会损伤自身胃黏膜,进一步加重了胃黏膜的损伤<sup>[11-12]</sup>。本研究发现,免疫性慢性胃炎大鼠血清胃泌素水平升高,可能是由于胃黏膜损伤,胃游离黏液代偿性增加;壁细胞损伤,胃酸分泌减少,反馈抑制胃泌素分泌的作用减弱所致。研究结果表明,DMY 对免疫性慢性胃炎大鼠有增加胃酸分泌、降低血清胃泌素水平和减少胃液中游离黏液的作用,使胃黏膜病理改变明显减轻,炎症指数下降,对胃黏膜起明显保护作用。

本研究表明,免疫性慢性胃炎大鼠体内 MDA 增加,总 SOD 和 Cu-Zn-SOD 活性降低,提示氧化与抗氧化平衡失调。可能是由于发生在胃黏膜中的抗原抗体反应形成的免疫复合物,经体内巨噬细胞和中性粒细胞吞噬处理,释放出大量氧自由基<sup>[13-14]</sup>。氧自由基进一步造成胃黏膜细胞损伤,使胃黏膜对营养物质的吸收减少,导致体内 SOD 合成减少<sup>[15]</sup>。研究发现,DMY 能保护胃黏膜,从而使体内 SOD 活性增加,清除氧自由基的作用增强。另外 DMY 具有抗氧化作用<sup>[16]</sup>,使体内氧化和抗氧化作用趋向平衡。

分布在胃黏膜中的 iNOS 基因在正常情况下不表达,但可被某些细胞因子激活而合成 iNOS,催化生成过量 NO。过量的 NO 通过与超氧阴离子的结合产生大量的 ONOO<sup>-</sup>。ONOO<sup>-</sup> 通过自由基链式反应,导致含巯基蛋白质的生成和脂质过氧化,从而促进炎症细胞损伤。ONOO<sup>-</sup> 是一种强氧化剂,可强烈地抑制细胞线粒体氧化呼吸,具有直接细胞毒作用<sup>[17]</sup>。本研究表明,免疫性慢性胃炎大鼠体内 iNOS 活性升高,NO 生成增加,可能是胃黏膜的炎性氧化损伤的一个重要机制。DMY 200 mg·kg<sup>-1</sup> 明显抑制大鼠体内 iNOS 活性,降低 NO 含量,具有调节体内 iNOS 活性和 NO 水平的作用,从而减轻氧自由基对胃黏膜的损伤。

体内 Th1 与 Th2 细胞处于动态平衡以维持正常的细胞免疫和体液免疫功能。Th1 细胞通过分泌 IFN-γ 和 IL-2 等促进细胞免疫功能,Th2 通过分泌 IL-4, IL-5 和 IL-6 等并辅助 B 细胞产生 IgG 参与体

液免疫<sup>[18]</sup>。正常胃黏膜中产生 IgG 的 B 细胞较少,但在黏膜炎症性疾病时 IgG 产生的细胞量显著增加。IgG 可激活补体及诱导粒-单核细胞在感染部位聚集,释放炎性介质及活性氧等物质,产生免疫损伤作用<sup>[10,19]</sup>。本研究结果表明,免疫性慢性胃炎大鼠血清 IL-2 明显降低,IL-4 明显升高,提示 Th1 免疫应答受到抑制,Th2 细胞应答处于优势,机体细胞免疫和体液免疫功能的平衡被破坏;同时 Th2 细胞亚群辅助 B 细胞产生 IgG,使慢性胃炎大鼠血清 IgG 明显升高。DMY 100 及 200 mg·kg<sup>-1</sup> 和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup> 均显著降低血清 IgG 水平;DMY 200 mg·kg<sup>-1</sup> 和瑞巴派特 27 mg·kg<sup>-1</sup> 能显著降低 IL-4 水平,升高 IL-2 水平,提示 DMY 可能通过协调 Th1 与 Th2 细胞平衡,抑制体液免疫反应,促进细胞免疫反应,使失衡的机体免疫功能重新达到平衡。

综上所述,DMY 对大鼠免疫性慢性胃炎胃黏膜具有明显保护作用,可能是通过调节机体免疫功能,抑制胃黏膜的自身免疫作用;增强氧自由基清除酶系统和降低 NO 生成酶系统的活性,抑制体内脂质过氧化物的生成而发挥作用。

#### 4 参考文献:

- [1] Yang XM, Chen LF. Study progress in biological activity of dihydromyricetin[J]. *Guiding J Tradit Chin Med Pharm*( 中医药导报), 2008, **14**(12):86-89.
- [2] Zhong ZX, Zhou GF, Chen XF, Qin JP. Experimental study on the protective effect of dihydromyricetin from Guangxi ampelopsis grossepentata on liver[J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*( 中国中医药科技), 2002, **9**(3):155-156.
- [3] Chen LF, Dong QQ, Zhang Q. Effects of dihydromyricetin on recurrent oral ulcers of rabbits[J]. *China J Chin Mater Med*( 中国中药杂志), 2008, **33**(2):176-180.
- [4] Ohana M, Okazaki K, Oshima C, Kawasaki K, Fukui T, Tamaki H, et al. Inhibitory effects of *Helicobacter pylori* infection on murine autoimmune gastritis [J]. *Gut*, 2003, **52**(8):1102-1110.
- [5] Wang ZH, Liu WW, Jiang SJ. Immune function changes in patients with atrophic gastritis[J]. *Int J Dig Dis* ( 国际消化病杂志), 1982, **2**(1):4-9.
- [6] Wang DM, Li DD, Cheng XX. Experimental model of gastric disease[M]//Xu SY, Bian RL, Chen X, eds. *Pharmacological Experimental Methodology* ( 药理实验方法学). 3rd ed. Beijing:People's Medical Publishing House, 2002:1333.
- [7] Gao F, Hu XF. Effect of somatostatin analogue octreotide injected into the third cerebral ventricle on pentagastrin-induced gastric acid secretion in rats[J]. *World J Gastroenterol*(Eng) ( 世界胃肠病学杂志:英文版), 2006, **12**(17):2767-2769.
- [8] Yang M, Sun H, Yu DW, Cui ZY, Tian J. Effects of the polysaccharides isolated from *Ganoderma applanatum* (PGA) on the level of PGE2 and gastric mucosal blood flow(GMBF) and gastric mucus secretion of rats with gastric mucosa injury[J]. *China J Chin Mater Med*( 中国中药杂志), 2005, **30**(15):1176-1178.
- [9] Wang LJ, Chen SJ, Si JM, Xu M. Effects of muscovite on cell proliferation of gastric mucosa in rats with chronic atrophic gastritis[J]. *Chin Pharm J*( 中国药学杂志), 2005, **40**(16):1226-1230.
- [10] Zhang B, Ren JL. Research approach on immunological mechanism of gastric mucosa[J]. *World Chin J Digestol* ( 世界华人消化杂志), 2005, **13**(21):2605-2609.
- [11] Micouin C, Rivat C, Bensa JC, Stoebner P, Favre M, Hudry E. A human immunoglobulin in myeloma protein with anti-gastric parietal cell autoantigen activity [J]. *Clin Exp Immunol*, 1977, **27**(1):78-84.
- [12] Ward HA, Nairn RC. Gastric parietal cell autoantigen. Physical, chemical and biological properties [J]. *Clin Exp Immunol*, 1972, **10**(3):435-451.
- [13] Shi HX, Ren JL. Oxygen radicals and gastric mucosa injury[J]. *World Chin J Digestol* ( 世界华人消化杂志), 2005, **13**(21):2582-2585.
- [14] Li W, Zhang S, Gao QH, Hou JW, Wei TT. Different effects of ferulic acid and tetramethylpyrazine on the production of superoxide anion and nitric oxide in murine macrophages[J]. *Res Chem Intermed*, 2004, **30**(6):605-613.
- [15] Liu HY, Wu JH, Yao ZP, Lu J, Ge ZT, Sheng DY, et al. Effect of supplement of vitamin C and vitamin E on the function of oxidation resistance in the middle-aged and old population[J]. *Chin J Dis Control Prev*( 疾病控制杂志), 2007, **11**(5):505-507.
- [16] He GX, Yang WL, Pei G, Zhu YH, Du FL. Studies on the effect of dihydromyricetin on antilipid-peroxidation [J]. *China J Chin Mater Med*( 中国中药杂志), 2003, **28**(12):1188-1190.
- [17] Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite[J]. *J Clin Invest*, 2002, **109**(6):817-826.

- [18] Li JY. T-lymphocyte subsets and their function[M]// Meng FP, Li FG, Wang H. *Basic Clinical Immunology* (临床免疫学基础). Zhengzhou: Zhengzhou University Publishing House, 2004:48-50.
- [19] Liu GF, Yao XX, Feng LY, Song M, Cui DL. Relationship of type TH1/TH2 cytokines in Hp infected gastric diseases[J]. *World Chin J Digestol*(世界华人消化杂志), 2000, 8(10):1105-1108.

## Protective effect and mechanism of dihydromyricetin on gastric mucosal injury of autoimmune chronic gastritis rats

CHEN Li-Feng\*, ZHANG Qiong, DONG Qian-Qian

(*Institute of Materia Medica, Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Changsha 410013, China*)

**Abstract:** **AIM** To study the protective effect of dihydromyricetin (DMY) on gastric mucosal injury of autoimmune chronic gastritis rats and mechanisms in order to provide experimental basis for DMY's applying in prevention and treatment on chronic gastritis. **METHODS** To emulsify supernatant of homogeneous gastric mucosa from Sprague-Dawley rats and Freund's complete adjuvant (FCA) as immunogen was subcutaneously injected into rat back and both sides of inguinals once every 15 d for 3 times to establish rat chronic gastritis model. At the same time of the second immunogen injection, DMY(50,100 and 200 mg·kg<sup>-1</sup>) or rebamipide(27 mg·kg<sup>-1</sup>) as positive control, were intragastrically administered once daily for 30 d. Water was used instead of drugs in normal and model groups. The rats were sacrificed on the next day after the last administration. The contents of total and free acids (TA and FA) were measured by acid-base titration and the content of free mucus was measured by alcian blue assay in gastric juice. The levels of gastrin and motilin were determined by radioimmunoassay, and the activities of total superoxide dismutase (SOD), Cu-Zn-SOD, Mn-SOD and inducible nitric-oxide synthase (iNOS), and the levels of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were determined by spectrophotometry. The levels of interleukin-2 (IL-2), IL-4 and immunoglobulin G (IgG) were assayed with ELISA. The histopathology of gastric mucosa

was examined under the microscope. **RESULTS** Compared with normal control, all detected indexes in model group changed pathologically except plasma motilin level. DMY significantly ameliorated these pathologically changed indexes of model rats. DMY increased contents of TA and FA, also decreased content of free mucus in gastric juice and gastrin level in serum, and had no effect on motilin in plasma; remarkably reduced inflammatory cells filtration into gastric mucosa tissue and the scores of inflammation, and obviously improved the histopathological changes in gastric mucosa; significantly raised total SOD, Cu-Zn-SOD, and Mn-SOD activities and reduced iNOS activity; inhibited production of MDA and NO; lowered IgG and IL-4 levels, and increased IL-2 levels. **CONCLUSION** DMY can significantly protect gastric mucosa from injury of chronic gastritis. Its mechanism maybe that DMY can regulate the body immune functions to inhibit the autoimmune reaction; or it can up-regulate the activity of enzyme system eliminating oxygen free radical and down-regulate activity of enzyme system producing NO, and then to inhibit lipid peroxidation.

**Key words:** dihydromyricetin; gastritis; gastric mucosa; immunity

**Foundation item:** The project supported by Science and Technology Fund of Hunan Province(04SK3067)

\* Corresponding author.

