苦丁茶对 SD 大鼠的胃损伤预防效果

冯霞，赵欣

（重庆第二师范学院生物与化学工程系，重庆 400067）

摘要：对重庆市售苦丁茶进行 SD 大鼠胃损伤预防效果研究。在本实验中两个浓度的苦丁茶样品和阳性药物奥美拉唑被用以检测。苦丁茶和奥美拉唑处理大鼠相对于对照组大鼠降低了血液中 IL-1β、IL-6 和 IL-8 炎症细胞因子水平；升高了 IL-4 因子水平。苦丁茶和阳性药物奥美拉唑组的血清 SS 和 VIP 水平高于对照组，MOT 和 SP 水平低于对照组。模型对照大鼠、500 mg/kg 苦丁茶处理大鼠、1000 mg/kg 苦丁茶处理大鼠、奥美拉唑处理大鼠和正常大鼠的呈胃液量由高到低排列，各组大鼠胃液 pH 值表现出相反的趋势。苦丁茶显著降低的大鼠胃损伤程度，表明其具有抗炎症特性，1000 mg/kg 苦丁茶表现出强抗炎症效果，仅比奥美拉唑略差。通过 RT-PCR 分析，苦丁茶处理组大鼠胃组织的 iNOS 和 COX-2 炎症 mRNA 表达较模型对照组大鼠显著下降。由这些结果得出苦丁茶具有和药物对照奥美拉唑一样的胃损伤预防效果。

关键词：大鼠；白细胞介素 4；白细胞介素 6；预防效果

文章篇号：1673-9078(2014)4-21-25

Preventive Effect of *Ilex kudingcha* C.J. Tseng on Gastric Injury SD-rats

FENG Xia, ZHAO Xin

(Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

Abstract: Commercial *Ilex kudingcha* C.J. Tseng (KDC) was purchased from Chongqing market for the evaluation of gastric injury preventive effect in SD-rat. Two concentrations of KDC samples and omeprazole as pharmic control were tested. KDC and omeprazole reduced the levels of serum proinflammatory cytokines of IL-1β, IL-6, IL-8, and increased the IL-4 level as compared to the control in rats. SS and VIP serum levels of KDC and omeprazole groups were higher than those of the control group, while MOT and SP serum levels of KDC and omeprazole groups were lower than those of the control group. The gastric secretion volumes from high to low order were control rats, 500 mg/kg KDC-treated rats, 1000 mg/kg KDC-treated rats, omeprazole-treated rats, and normal rats, whereas pH levels of gastric juice showed the opposite trend. The gastric injury level was significantly decreased by KDC, demonstrating its anti-inflammatory properties. 1000 mg/kg of KDC showed the strongest anti-inflammatory effect that similar to the clinical drug omeprazole. For gastric tissues of KDC groups and omeprazole group rats, RT-PCR assay showed that the mRNA expression levels of inflammation-related genes of iNOS and COX-2 were significantly decreased, as compared with the control group. These results suggested that KDC had a gastric injury preventive effect as omeprazole.

Key words: rat; interleukin 4; interleukin 6; preventive effect

苦丁茶（*Ilex kudingcha* C. J. Tseng）是野生冬青科冬青属苦丁茶种常绿乔木，俗称茶丁、富丁茶、皋卢茶，是我国南方地区经常饮用的一类茶，是传统的药用植物[1]。苦丁茶作为传统饮品和药用植物，在传统医学上具有清热消暑、明目益智、生津止渴、利尿强心、润喉止咳、降压减肥、抑癌防癌、抗衰老、活血脉等多种功效，是一种很好的医药保健饮料[2]。苦丁茶中含有丰富的水浸出物、多酚类物质、氨基酸，胡萝卜素和维生素等，由于这些功能性成分的存在，在近年的研究中已经表明苦丁茶具有抗菌消炎、调节心血管、生殖和免疫系统的功效[3]。胃损伤是胃部疾病主要表现之一，引起胃部不适、胃部疼痛甚至胃出血等症状，临床表现为胃部反酸、烧心、消化不良、腹部胀痛等，酒精等刺激性物质、某些药物可能会导致胃损伤[4]。特别是近些年，酒精急性胃炎发病率大幅度增加，乙醇对胃的损伤，主要原因是乙醇能够增强细胞膜的通透性，破坏胃粘膜屏障导致胃黏膜损伤，同时乙醇还刺激胃组织剧烈蠕动，引发机械性损伤，盐酸可以进一步加强这种损伤[5]，故本研究采用乙醇与盐酸共同作用建立动物模型进行实验。近年来各种保健茶饮品的保健功能方面的研究引起了关注，相关

收稿日期：2013-11-17

基金项目：重庆高校创新团队建设计划资助项目（KJTD201325）

作者简介：冯霞（1976-），女，讲师，研究方向为功能性食品的保健效果

通讯作者：赵欣（1981-），男，博士，教授，研究方向为功能性食品的保健效果

的研究工作有了一定的进展，本研究初步对重庆市售苦丁茶进行 SD 大鼠胃损伤预防效果的研究。同时，奥美拉唑是一种抗酸及抗溃疡药，能够快速有效的抑制胃酸的分泌，已经有研究表明其对大鼠的胃粘膜损伤具有保护作用[6]，在本实验中选用其作为药物对照，以便更有效评价苦丁茶的保健功效。

1 材料与方法

1.1 样品

苦丁茶：重庆市售苦丁茶(海南产椰仙牌苦丁茶)，为海南野生苦丁茶，在-50 ℃，2.0 Pa 下对其进行冷冻干燥后按茶水比 1:10，用沸水提取，每次 20 min，重复 3 次，合并提取液用旋转蒸发仪蒸干后得到水提物待用。

1.2 试剂

盐酸、无水乙醇、福尔马林（40%）、三羟甲基氨基甲烷（Tris）、十二烷基硫酸钠（SD），成都市科龙化工试剂厂；细胞因子 IL-1β、IL-4、IL-6 和 IL-8，美国 Biolegend 公司；胃动素（MOT）、生长抑素（SS）、P 物质（SP）和血管活性肠肽（VIP）血清因子试剂盒，北京普尔伟业生物科技有限公司；Trizol 总 RNA 抽提剂，美国 Invitrogen 公司；RT-PCR 引物，德国 Eppendorf 公司；脱氧核糖核酸酶，瑞士 Roche 公司；RNeasy，德国 Qiagen 公司。

1.3 仪器

ServenEasy 型 pH 计，瑞士 Mettler-Toledo 公司；DU-70 型紫外分光光度计，美国 Beckman 公司；SIGMA 低温离心机，德国 SIGMA 公司；T100 型 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；JS-Power 600 型电泳仪、JS-680D 型凝胶成像分析仪，上海培清科技有限公司。

1.4 实验动物

七周龄雄性 SD 大鼠，购于重庆医科大学实验动物中心（动物合格证号：SCXK（渝）2007-0001）。饲养条件为：室温 23±1 ℃、相对湿度 50±5%，SD 大鼠自由饮水和摄食。

1.5 SD 大鼠诱导胃损伤

将 SD 大鼠随机分为一个正常对照组、一个模型对照组、两个苦丁茶实验组和一个阳性药物奥美拉唑组，共 5 组，每组 10 只。其中正常对照组的 SD 大鼠正常饲养，不进行任何实验处理；模型对照组的 SD 大正常饲养，不进行样品处理，最后对其进行诱导胃损伤；苦丁茶实验组的 SD 大鼠用一定浓度的苦丁茶样品进行灌胃处理，将苦丁茶水提物按 500 和 1000 mg/kg 浓度对实验组 SD 大鼠每天用 2 mL 样品进行灌胃处理一次，连续进行 2 周，最后对其进行诱导胃损伤处理。阳性药物奥美拉唑组的大鼠每天按 20 mg/kg 浓度用奥美拉唑进行灌胃处理。2 周后对模型对照组、苦丁茶实验组和阳性药物奥美拉唑组大鼠进行胃损伤诱导处理，先用无水乙醇溶于 150 mM 盐酸配制成含 60%的乙醇的胃损伤化学诱导溶液，然后取 1 mL 配制好的诱导溶液对 SD 大鼠实施灌胃，1 h 后将 5 组 SD 大鼠全部处死，取其胃、胃液、血浆待用。

1.6 酶联免疫吸附测定法测定 SD 大鼠血清中 IL-1β、IL-4、IL-6 和 IL-8 水平

分别取 2 mL 各组 SD 大鼠的血浆，恒温 4 ℃，转速 3000 r/min 离心 10 min 后，取上层血清。用定量 ELISA 检测试剂盒按酶联免疫吸附测定法操作，然后用酶标仪对血清中 IL-1β、IL-4、IL-6 和 IL-8 水平进行测定。

1.7 大鼠血清因子水平的测定

取大鼠动脉血浆 0.2 mL，在 4 ℃，3000 r/min 下离心分离 10 min，取上层血清，按试剂盒说明书的方法测定胃动素（MOL）、生长抑素（SS）、P 物质（SP）和血管活性肠肽（VIP）的水平。

1.8 RT-PCR 法检测胃组织炎症水平

各组大鼠解剖后取胃组织，用 RNAzol 试剂提取胃组织细胞的总 RNA。定量分离到 RNA 后，用 oligo dT 在 AMV 逆转录酶作用下制备 ss cDNA，然后以该 cDNA 为模板，反转录-聚合酶链反应法扩增 iNOS 基因引物：同义 5'-AGAGAGATCGGGTTCACA-3'，反义 5'-CACAGAACTGAGGGTACA-3'；COX-2 基因引物：同义 5'-TTAAAATGAGATTGTCCGAA-3'，反义 5'-AGATCACCTCTGCCTGAGTA-3' 。 持 家 基 因 GAPDH（同义 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTC-3'，反义 5'-AGCCTTCTCCATGGTCGTGA-3'）作为对照内参照。以上程序结束后，以含浓度溴化乙锭的 1%琼脂电泳检查 PCR 扩增产物[7]。

1.9 大鼠胃液量和胃液 pH 值测定

分别对各组 SD 大鼠进行解剖，然后取其胃液测定胃分泌量，用酸度计测定其胃液的 pH 值。

1.10 数据统计

使用 SAS 统计软件对所得到数据采用 one-way ANOVA 法分析数据结果是否具有显著性差异（$p<0.05$）。

2 结果与讨论

2.1 大鼠血清中细胞因子水平

通过酶联免疫吸附测定法测定大鼠血清中 IL-1β、IL-4、IL-6 和 IL-8 水平。正常对照组和模型对照组大鼠血清中的各细胞因子均具有显著性差异（$p<0.05$），胃损伤造模对血清中细胞因子产生了明显的影响，其中苦丁茶高低浓度组大鼠血清的 IL-1β、IL-6 和 IL-8 水平均显著高于正常对照组和阳性药物奥美拉唑组，低于模型对照组，IL-4 水平呈相反的趋势。1000 mg/kg 浓度苦丁茶组大鼠的 IL-1β、IL-6 和 IL-8 血清水平低于 500 mg/kg 浓度苦丁茶组，IL-4 水平高于 500 mg/kg 组（$p<0.05$，图 1）。根据 IL-1β、IL-4、IL-6 和 IL-8 水平与炎症发生的相关性，IL-1β、IL-6 和 IL-8 水平降低说明大鼠的炎症降低[8]。IL-8 是趋化性细胞因子，参与机体炎症和免疫反应，可以促进炎症细胞增殖；IL-6 对 IL-8 的产生有诱导作用，可以进一步促进炎症；IL-4 可以抑制 IL-6 的分泌，能在组织损伤中起到减缓损伤的作用[9]。根据以上分析得出看出不同浓度苦丁茶均有一定的降低胃损伤程度的效果，随着浓度的提高，效果越明显。

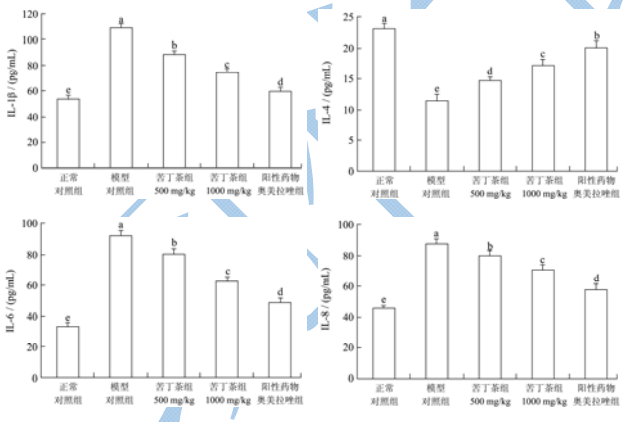


图 1 苦丁茶对大鼠的 IL-1β、IL-4、IL-6 和 IL-8 细胞因子水平影响

Fig.1 Effect of *Ilex kudingcha* C.J. Tseng on cytokine levels of IL-1β, IL-4, IL-6 and IL-8 in rats

注：a~e 不同字母表示差异显著（$p<0.05$），相同字母表示差异不显著（$p>0.05$）。

2.2 大鼠血清中血清因子水平

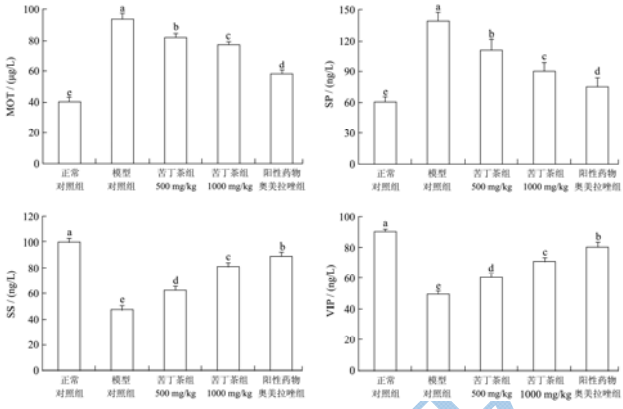


图 2 苦丁茶对大鼠的 MOT，SP，SS 和 VIP 血清因子水平影响

Fig.2 Effect of *Ilex kudingcha* C.J. Tseng on serum levelsof MOT, SP, SS and VIP in rats

注：a~e 不同字母表示差异显著（$p<0.05$），相同字母表示差异不显著（$p>0.05$）。

由图 2 可知，正常对照组大鼠表现出最低的 MOT 和 SP 因子水平和最高的 SS 和 VIP 因子水平，模型对照组大鼠则表现出最低的 MOT 和 SP 因子水平和最高的 SS 和 VIP 因子水平。苦丁茶提取物能显著降低血清 MOT 和 SP 因子含量，增加 SS 和 VIP 因子含量（$p<0.05$）。1000 mg/kg 浓度苦丁茶水提物灌胃大鼠的各血清因子水平最接近正常对照组和阳性药物奥美拉唑组。MOT 和 SP 是兴奋性胃肠激素，被刺激后含量升高，同时引起胃酸大量分泌，大量胃酸使胃内部呈酸性，加剧胃损伤[10]。SS 和 VIP 是抑制性胃肠激素，可以抑制胃酸的分泌[11]。可见苦丁茶水提物灌胃后大鼠的胃酸分泌被更好的抑制，胃损伤引起的血清因子变化减弱，表现出对胃损伤良好的抑制效果。

2.3 大鼠胃损伤水平

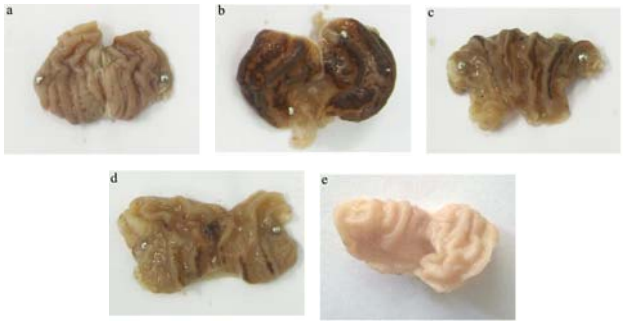


图 3 苦丁茶处理大鼠的胃损伤外形观察

Fig.3 Stomach appearance of Ilex kudingcha C.J. Tseng treatment in rats

注：a：正常对照组，b：模型对照组，c：500 mg/kg 苦丁茶组，d：1000 mg/kg 苦丁茶组，e：阳性药物奥美拉唑组。

酒精易引发急性胃损伤，临床表现为常见的胃黏

膜炎，可造成胃黏膜上皮层损伤、使上皮顶端胞浆膜遭到破坏从而导致细胞脱落、胃多发性溃疡甚至引起胃出血[5]。本研究用盐酸和酒精共同作用，加强了酒精对胃黏膜损伤的程度，用 ImageJ 软件分析解剖后各组大鼠胃组织损伤的程度。模型对照组 SD 大鼠的胃损伤面积为 14.22±3.41 mm^2，较正常对照组产生了最大的胃损伤面积。用不同浓度的苦丁茶对 SD 大鼠进行灌胃处理后胃损伤程度都有所下降。采用 500 mg/kg 和 1000 mg/kg 浓度苦丁茶灌胃处理后 SD 大鼠的胃损伤程度分别为 5.24±2.12 和 3.76±1.43 mm^2，而奥美拉唑处理大鼠则没有出现胃损伤（表 1，图 3）。通过各组大鼠和图片的比较可以得出随着苦丁茶灌胃浓度的增加 SD 大鼠的胃损伤程度随之降低，证明一定浓度的苦丁茶对胃损伤有一定的抑制效果，而且浓度增加抑制效果越明显。

表 1 各组大鼠的胃损伤面积和胃损伤抑制率

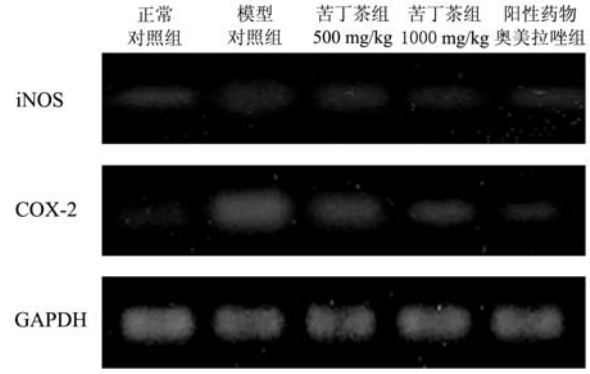
Table 1 Gastric injury level and inhibitory rate of rats in each group

组别	正常对照组	模型对照组	苦丁茶组(500 mg/kg)	苦丁茶组(1000 mg/kg)	阳性药物奥美拉唑组
胃损伤程度	0.00±0.00^d	14.22±3.41^a	5.24±2.12^b	3.76±1.43^c	0.00±0.00^d
抑制率/%	100.00	0.00	63.15	73.56	100.00

注：a~d 不同字母表示差异显著（p<0.05），相同字母表示差异不显著（p>0.05）。

2.4 大鼠胃组织 iNOS 和 COX-2 基因的 mRNA 表达影响

通过 RT-PCR 和 Western blot 分析可以看出模型对照组的 iNOS 和 COX-2 表达最强，正常对照组的表达最弱（图 4）；苦丁茶灌胃大鼠胃组织中 iNOS 和 COX-2 基因的 mRNA 表达与其他组大鼠具有显著性差异（p<0.05），苦丁茶水提物灌胃组 iNOS 和 COX-2 表达显著低于模型对照组，其中 1000 mg/kg 高浓度灌胃组显著低于低浓度灌胃组，但是高于正常对照组和阳性药物奥美拉唑组。iNOS 表达在机体正常情况下不显示，但在炎症状态下大量产生[12]，COX-2 在胃炎、胃黏膜损伤及胃癌中的表达较正常情况也出现增加的趋势[13]。有研究表明 iNOS 和 COX-2 基因都是炎症相关基因，组织出现炎症后，两种基因的表达升高的特性可以作为判断炎症和组织损伤的标准[7]，在本实验中苦丁茶灌胃组大鼠胃组织的 iNOS 和 COX-2 表达低于模型对照组，接近于正常对照组，验证出苦丁茶具有好的抑制炎症，治疗胃损伤的效果。



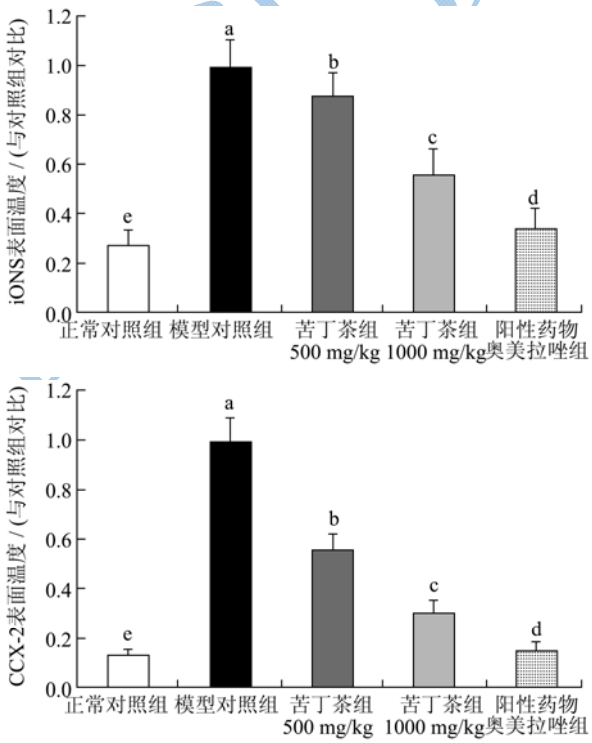


图 4 苦丁茶对大鼠胃组织炎症基因的表达

Fig.4 Inflammatory gene expressions of gastric tissue in Ilex kudingcha C.J. Tseng treated rats

注：a~e 不同字母表示差异显著（p<0.05），相同字母表示差异不显著（p>0.05）。

2.5 SD 大鼠胃液量和胃液 pH 值

通过实验测得正常对照组和模型对照组的胃液分泌量和胃液 pH 值分别为 1.3±0.3 mL 和 3.7±0.8 mL，3.2±1.0 mL 和 1.2±0.2 mL，正常对照组和模型对照组的胃液分泌量、胃液 pH 具有显著性差异，且差异大于与其他各组之间的差异（p>0.05）。500 和 1000 mg/kg 浓度苦丁茶灌胃处理后胃液分泌量和 pH 值分别为

2.6±0.4 mL 和 2.3±0.5，2.1±0.4 mL 和 3.0±0.5。阳性药物奥美拉唑组大鼠的胃液分泌量和 pH 值为 1.9±0.3 mL 和 3.6±0.4。同时苦丁茶组 SD 大鼠灌胃处理后的胃液分泌量随着苦丁茶浓度增加而减少，胃液的 pH 值则随之增大。大量实验已经证实，胃损伤出现时，胃液分泌量大幅度增加，同时胃液的 pH 值也降低，可作为衡量胃损伤的标志之一[14]。通过各组数据的比较可以看出随着苦丁茶浓度的增加，胃液分泌量随之减少而 pH 值随之增大，胃液分泌量和 pH 值接近正常对照组和阳性药物奥美拉唑组，证明一定浓度的苦丁茶对胃损伤有一定的预防效果，而且浓度增加预防效果越明显。

3 结论

本研究以苦丁茶作为研究对象，从胃损伤抑制率、血清中炎症因子水平、胃肠相关因子、胃液分泌量、胃液 pH 值、胃组织中 mRNA 表达等方面进行大鼠体内胃溃损伤程度进行了研究，观察到一定浓度的苦丁茶水提物可以起到减轻胃损伤的作用，并且随着苦丁茶浓度的增加胃损伤预防效果越明显。苦丁茶对胃损伤预防效果的进一步机理和人体实验有待进一步深入的研究。

参考文献

[1] ZHAO X, WANG Q, QIAN Y, et al. *Ilex kudingcha* C.J. Tseng (Kudingcha) has in vitro anticancer activities in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells and exerts anti-metastatic effects in vivo [J]. Oncology Letters, 2013, 5(5): 1744-1748

[2] SONG J L, QIAN Y, LI G J, et al. Anti-inflammatory effects of kudingcha methanol extract (*Ilex kudingcha* C.J. Tseng) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis [J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 8(4): 1256-1262

[3] ZHAO X, WANG Q, QIAN Y, et al. *Ilex kudingcha* C.J. Tseng (Kudingcha) prevents HCl/ethanol‐induced gastric injury in Sprague‐Dawley rats [J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 7(5): 1613-1616

[4] SZABO S, TRIER J S, BROWN A, et al. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat [J]. Gastroenterology, 1985, 88 (1 Pt 2): 228-236

[5] MEDEIROS J V, GADELHA G G, LIMA S J, et al. Role of the NO/cGMP/KATP pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats [J]. British Journal of Pharmacology, 2008, 153(4): 721-727

[6] 乐桥良,张捷,许其增,等.奥美拉唑对大鼠胃粘膜损伤保护作用及其机制的初步探讨[J].海峡药学,2001,13(3):32-34
LE Q L, ZHANG J, XU Q Z, et al. The protective effect of omeprazole on the gastric mucosal lesion in rats and it's mechanisms [J]. Hai Xia Yao Xue, 2001, 13(3): 32-34

[7] ZHAO X. Hawk tea (*Litsea coreana* Levl. var. lanuginose) attenuates CCl4-induced hepatic damage in Sprague-Dawley rats [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 5(2): 555-560

[8] NAKANISHI K, TSUTSUI H, YOSHIMOTO T. Effects of expression of serum IL-4, IL-6, IL-8 induce hepatic fibrosis in carbon tetrachloride attacked mice [J]. West China Medical Journal, 2010, 59(2): 137-141

[9] 马玉珍,陈玮,韩景田,等.CCl4 攻击大鼠致肝纤维化血清 IL-4、IL-6、IL-8 表达的影响[J].华西医学,2010,25(1):44-45
MA Y Z, CHEN W, HAN J T, et al. Effects of Expression of Serum IL-4, IL-6, IL-8 Induce Hepatic Fibrosis in Carbon Tetrachloride Attacked Mice [J]. West China Medical Journal, 2010, 25(1): 44-45

[10] 王海燕,刘亚明,李海燕,等.高良姜油对胃溃疡小鼠模型血清胃动素、生长抑素、P 物质、血管活性肠肽的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):105-107
WANG H Y, LIU Y M, LI H Y, et al. Effects of oils in alpinia officinarum hance on serum motilin, somatostatin, substance P, vasoactive intestinal peptide in gastrelcosis mice model [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(4): 105-107

[11] 谭婷婷,张琴,彭燕.辣椒素对胃酸分泌的影响及机制[J].世界华人消化杂志,2009,17(36):3699-3703
TAN T T, ZHANG Q, PENG Y. Effects of capsaicin on gastric acid secretion and mechanisms involved [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(36): 3699-3703

[12] ZHAO X, KIM SY, PARK KY. Bamboo salt has in vitro anticancer activity in HCT-116 cells and exerts anti-metastatic effects *in vivo* [J]. Journal of Medicinal Food, 2013, 16(1): 9-19

[13] ZHAO X, SONG JL, KIL JH, et al. Bamboo salt attenuates CCl4-induced hepatic damage in Sprague-Dawley rats [J]. Nutrition Research and Practice, 2013, 7(4): 273-280

[14] Leindler L, Morschl E, Laszlo F, et al. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats [J]. Pancreas, 2004, 29(2): 157-161