【基础研究】

美沙拉嗪对乙醇所致大鼠急性胃溃疡的保护作用及机制探讨

田　华[1]，李晓利[1]，王金叶[1]，黄　静[2*]

（1. 西安交通大学附属红会医院老年病科，陕西西安 710054；2. 西安交通大学附属红会医院临床药学科，陕西西安 710054）

摘要：目的 评估美沙拉嗪对乙醇所致大鼠胃溃疡（gastric ulcer，GU）保护作用及机制。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分为对照组、溃疡组、奥美拉唑＋溃疡组及美沙拉嗪＋溃疡组，每组 10 只。通过口服无水乙醇（5 ml/kg）造成大鼠 GU。奥美拉唑组和美沙拉嗪组在服用乙醇前 1 h 分别口服奥美拉唑（20 mg/kg）和美沙拉嗪（50 mg/kg）。乙醇处理后 1 h，观察各组大鼠溃疡面积、病理组织学、脂质过氧化和抗氧化酶水平，以及核因子（nuclear factor，NF）-κB 活化。**结果** 美沙拉嗪预处理显著降低无水乙醇诱导的 GU、出血、充血及胃黏膜上皮细胞丢失。美沙拉嗪处理降低胃组织中丙二醛水平，增加总谷胱甘肽和超氧化物歧化酶水平；此外，其还提高环氧合酶 -1 和前列腺素 E_2（prostaglandin E_2，PGE_2）表达水平，并降低 NF-κB 活化。**结论** 美沙拉嗪通过防止氧化损伤、刺激 PGE_2 产生和抑制 NF-κB 激活，在乙醇诱导的急性 GU 中发挥保护作用。

关键词：美沙拉嗪；胃溃疡；氧化损伤；核因子 -κB

中图分类号：R573.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2023）06-0547-05

DOI：10.13683/j.wph.2023.06.006

Protective effects of mesalazine on ethanol induced acute gastric ulcer in rats and its mechanism

TIAN Hua[1], LI Xiaoli[1], WANG Jinye[1], HUANG Jing[2*]

（*1. Department of Geriatrics, Honghui Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, Shanxi Province, China;*

2. Department of Clinical Pharmacy, Honghui Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, Shanxi Province, China）

Abstract: ***Objective*** To evaluate the protective effects and mechanism of mesalazine on ethanol induced gastric ulcer（GU）in rats. ***Methods*** Male SD rats were randomly divided into control group, ulcer group, omeprazole＋ulcer group and mesalazine＋ulcer group, with 10 rats in each group. GU was caused by oral administration of absolute ethanol（5 ml/kg）in rats. Omeprazole group and mesalazine group took omeprazole（20 mg/kg）or mesalazine（50 mg/kg）orally one hour before taking ethanol, respectively. One hour after ethanol treatment, the ulcer area, histopathology, lipid peroxidation, antioxidant enzymes and phosphorylation of nuclear factor（NF）-κB were observed. ***Results*** Mesalazine pretreatment significantly decreased alcohol-induced GU, hemorrhage, hyperemia, and epithelial cell loss in the gastric mucosa. Mesalazine pretreatment reduced the level of malondialdehyde and increased total glutathione and superoxide dismutase in gastric tissues. In addition, it increased the expression levels of cyclooxygenase-1 and prostaglandin（PG）E_2, and decreased the phosphorylation of NF-κB. ***Conclusion*** Mesalazine could effectively inhibit ethanol induced acute gastric injury by preventing oxidative damage, stimulating PGE_2 production, and inhibiting NF-κB activation.

Key words: mesalazine; gastric ulcer; oxidative damage; nuclear factor-κB

美沙拉嗪是治疗溃疡性结肠炎的首选药物，可通过抑制肠黏膜的前列腺素合成和炎症介质白三烯的形成，对肠道炎症有显著的抗炎作用[1—3]。目前尚无美沙拉嗪对乙醇诱导胃溃疡（gastric ulcer，GU）的研究报道。因此，本研究建立乙醇诱导 GU 大鼠模型，旨在评估美沙拉嗪的胃黏膜保护作用。

收稿日期：2023-02-03

作者简介：田华，主治医师，研究方向：胃溃疡的治疗。

通信作者：黄静，主管药师，研究方向：中药物质基础分析。

基金项目：陕西省自然科学基础研究项目（2020JQ-962）

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性 SD 大鼠（150 ～ 200 g，7 周），购于西安交通大学动物中心，实验动物生产批准号：SCXK（陕）2018-001；实验动物使用许可证号：SYXK（陕）2020-005。室温自由饮食和饮水。

将 40 只 SD 大鼠随机分成对照组、溃疡组、奥美拉唑＋溃疡组及美沙拉嗪＋溃疡组，每组 10 只。大鼠通过口服无水乙醇诱发 GU[4]。奥美拉唑组（20 mg/kg）和美沙拉嗪组（50 mg/kg）在服用乙醇前 1 h 分别口服给药。服用乙醇后 1 h 处死大鼠，并收集胃。

研究经本院医学伦理委员会审核批准（2021321），并遵守“3R”原则。

1.2 实验仪器和试剂

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪（美国 ABI 公司）；光学显微镜（日本 Olympus 公司）。

美沙拉嗪（葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司）；奥美拉唑（山东新时代药业有限公司）；苏木精 - 伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色染料（美国 Sigma 公司）；丙二醛（malondialdehyde，MDA）、总谷胱甘肽（glutathione，GSH）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、前列腺素 E_2（prostaglandin E_2，PGE_2）及检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）；鼠源核因子（nuclear factor，NF）-κB（N8523）和 p-NF-κB 抗体（SAB4301496）购自美国 Sigma 公司。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及定量反转录 PCR 试剂盒（南京建成生物工程研究所），引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.3 溃疡面积评估

各组大鼠口服乙醇 1 h 后颈椎脱位处死，剖腹，取出胃，切开胃的大曲度，用生理盐水冲洗干净，压平胃组织并拍照，测量溃疡面积。

1.4 病理组织学分析

切下含有溃疡部分胃进行组织学研究，胃组织用 10% 福尔马林缓冲液固定，石蜡包埋，5 μm 连续切片，进行 HE 化学染色。

1.5 测定 MDA、GSH、SOD 及 PGE_2 含量

将剩余胃组织均质化进行 MDA 和 SOD 的活性测量。分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法，按照试剂盒说明书操作步骤检测。为了评估 GSH，在 5% 偏磷酸溶液中制备组织裂解物，4 ℃高速离心 15 min，使用试剂盒评估。采用相应试剂盒评估上清液中 PGE_2，ELISA 微孔板阅读器在 450 nm 处测量吸光度。

1.6 蛋白质印迹法（western blot，WB）分析

在含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀分析缓冲液中研磨胃组织。离心并收集上清液。蛋白质含量采用 Bradford 法分析。组织蛋白通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，在 350 mA 条件下转移到聚偏二氟乙烯膜上 2 h，在含有 5% 胎牛血清的 PBS 中孵育 1 h，然后在 4 ℃与 NF-κB（1 ∶ 1 000）或 p-NF-κB（1 ∶ 1 000）抗体孵育过夜。用 PBS 缓冲液清洗后，将膜暴露于山羊抗鼠二抗（1 ∶ 10 000）2 h，并使用化学发光底物显影。

1.7 RT-PCR 分析

采用 RNA 提取试剂盒分离胃组织中 RNA。采用分光光度剂评估 RNA 水平，并确定其纯度。提取 RNA 被反向转录，并使用 ABI PCR 系统测量相关信使 RNA（messenger RNA，mRNA）表达水平。环氧合酶（cyclooxygenase，COX）-1F: 5'-TGACTATCTGGCGGGTGACT-3'；COX-1R: 5'-CTTGCTGGA CAT TGGG TTCT-3'；甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）F: 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'；GAPDH R: 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'。PCR 数据为目标基因相对于 GAPDH 水平倍数变化，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算[5]。

1.8 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析，本研究数据均符合正态分布，以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用

单因素方差分析，组间两两比较采用 Tukey's 检验，以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 美沙拉嗪对 GU 的影响

正常对照组无损伤，溃疡组胃腺层中检测到严重溃疡并伴有细长带状出血，但在奥美拉唑和美沙拉嗪组中，乙醇诱导的胃损伤减轻（图 1）。溃疡组、奥美拉唑组及美沙拉嗪组 GU 面积分别为（154.3±16.7）、（65.2±7.8）及（74.3±8.1）mm^2，后二者均显著降低（$P < 0.01$）。组织病理学分析显示，溃疡组大鼠出现严重出血、广泛黏膜下水肿及胃组织中胃黏膜丧失，而经奥美拉唑或美沙拉嗪预处理可显著减少乙醇诱导的胃损伤（图 2）。

2.2 美沙拉嗪对脂质过氧化和抗氧化作用的影响

各组大鼠 MDA、GSH 和 SOD 浓度详见表 1。较正常对照组，溃疡组胃组织中 MDA 水平显著升高（$P < 0.01$），而奥美拉唑或美沙拉嗪预处理显著降低乙醇诱导的 MDA 增加（$P < 0.01$）。溃疡组胃 GSH 浓度和 SOD 活性低于正常对照组（$P < 0.01$），但奥美拉唑或美沙拉嗪预处理显著减弱上述指标降低，因此奥美拉唑和美沙拉嗪组 GSH 浓度和 SOD 活性均高于溃疡组（$P < 0.01$）。

2.3 美沙拉嗪对 NF-κB 活化影响

WB 分析显示（图 3、表 2），较对照组，溃疡

表 1 各组大鼠 MDA、GSH 和 SOD 浓度比较（$n = 5$）

Table 1 Comparison of MDA, GSH and SOD activities in each group（$n=5$）

组别	MDA/μmol·L^{-1}	总谷胱甘肽/μmol·L^{-1}	SOD/U
对照组	13.5±1.6	6 000.0±585.4	6 200.4±654.2
溃疡组	26.4±2.9$^{\#}$	1 945.0±200.6$^{\#}$	4 005.3±413.9$^{\#}$
奥美拉唑组	19.6±2.1*	4 000.0±409.3*	5 100.4±518.6*
美沙拉嗪组	18.7±1.9*	3 897.6±395.8*	5 082.8±509.4*

注：较对照组，$^{\#}P<0.01$；较溃疡组，$*P<0.01$。

Note: *vs* control group, $^{\#}P<0.01$; *vs* ulcer group, $*P<0.01$.

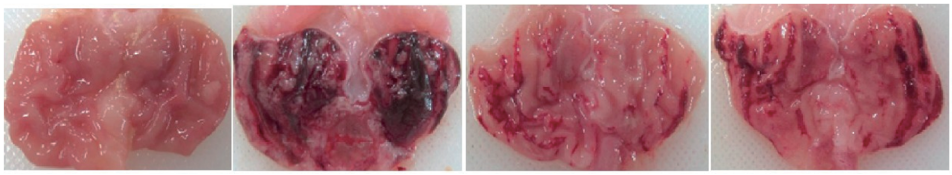
表 2 各组大鼠 NF-κB 蛋白相对表达（$n = 5$）

Table 2 NF-κB protein expression of rats in each group（$n=5$）

组别	p-NF-κB	NF-κB
对照组	0.0±0.0	0.90±0.10
溃疡组	0.48±0.09$^{\#}$	0.94±0.14
奥美拉唑组	0.12±0.03*	0.96±0.12
美沙拉嗪组	0.21±0.05*	0.95±0.13

注：较对照组，$^{\#}P < 0.01$；较溃疡组，$*P < 0.01$。

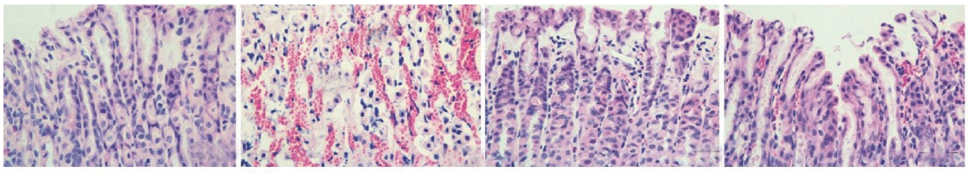
Note: *vs* control group, $^{\#}P < 0.01$; *vs* ulcer group, $*P < 0.01$.



对照组　溃疡组　奥美拉唑组　美沙拉嗪组

图 1 各组大鼠 GU 比较

Figure 1 Comparison of GU in each group



对照组　溃疡组　奥美拉唑组　美沙拉嗪组

图 2 各组大鼠胃组织 HE 染色（×400）

Figure 2 HE staining of gastric tissue in each group（×400）

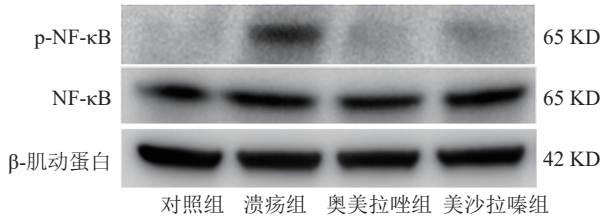


图 3 各组大鼠典型 WB 图片

Figure 3 Typical WB pictures of rats in each group

组胃组织中 NF-κB 磷酸化增加（$P < 0.01$）；但较溃疡组，奥美拉唑或美沙拉嗪预处理显著减弱了 p-NF-κB 表达（$P < 0.01$）。

2.4 美沙拉嗪对 COX-1 和 PGE_2 表达影响

如表 3 所示，较对照组，溃疡组胃组织 COX-1 mRNA 表达水平升高（$P < 0.01$），奥美拉唑或美沙拉嗪预处理进一步增强 COX-1 mRNA 表达（$P < 0.01$）。较对照组，溃疡组 PGE_2 水平降低（$P < 0.01$），但经奥美拉唑或美沙拉嗪预处理后，该水平显著升高（$P < 0.01$）。

表 3 各组大鼠 COX-1 mRNA 和 PGE_2 表达比较

Table 3 Comparison of COX-1 mRNA and PGE_2 expression in rats of each group

组别	COX-1 mRNA	PGE_2/pg·ml^{-1}
对照组	1.3±0.2	568.0±60.4
溃疡组	1.9±0.2$^{\#}$	487.3±51.3$^{\#}$
奥美拉唑组	7.0±0.7*	954.2±100.7*
美沙拉嗪组	9.3±1.1*	1150.6±120.0*

注：较对照组，$^{\#}P<0.01$；较溃疡组，$*P<0.01$。

Note: *vs* control group, $^{\#}P<0.01$; *vs* ulcer group, $*P<0.01$.

3 讨论

乙醇诱导的 GU 是一种经典模型，在评估胃内药物保护作用的研究中常被使用[6]。本研究评估美沙拉嗪对乙醇诱导大鼠胃黏膜损伤潜在保护作用，发现美沙拉嗪预处理可保护胃组织免受乙醇诱导的急性损伤，抑制脂质过氧化和 NF-κB 活化，同时增加抗氧化活性和 PGE_2 表达。此外，美沙拉嗪预处理显著提高 SOD 和 GSH 水平，降低 MDA 水平。这与之前的报道一致[7—8]，说明美沙拉嗪通过清除羟自由基发挥强大的抗氧化活性，并能恢复细胞抗氧化防御酶，包括 SOD、过氧化氢酶及 GSH 过氧化物酶。本文结果首次证实，美沙拉嗪可通过抗氧化机制发挥胃保护作用。

活性氧激活 NF-κB，这是一个关键的调节因子，可促进炎症、细胞存活及免疫反应相关基因转录[9]。在乙醇诱导 GU 形成过程中，NF-κB 控制编码诱导型一氧化氮合酶、COX-2 及炎性细胞因子基因转录增加[10]，其表达是 GU 形成的关键环节，成为治疗炎症的合理靶点[11]。本研究显示，乙醇给药诱导 p-NF-κB 显著增加，而美沙拉嗪预处理显著抑制其增加，说明美沙拉嗪通过抑制 IκB 激酶 /NF-κB 依赖性信号传导发挥抗炎活性[12]。胃黏膜细胞产生 PG，在急性胃黏膜损伤期间作为重要的内源性介质发挥作用，并通过调节酸分泌和刺激黏液、碳酸氢盐及磷脂分泌来促进黏膜防御。PG 还能加速上皮恢复和黏膜愈合，并通过增加血管通透性来介导炎症反应，从而导致血管扩张和血流量增加[13]。PG 由 COX 酶产生，其中，COX-1 产生的 PG 在体内平衡功能中发挥重要作用，包括维持黏膜完整性和黏膜血流[14]。本研究显示，美沙拉嗪组胃组织 COX-1 和 PGE_2 水平显著高于溃疡组。这表明美沙拉嗪通过 COX-1 和 PGE_2，对乙醇诱导胃黏膜损伤发挥保护作用。

本研究选用抑制胃酸分泌的质子泵抑制剂奥美拉唑作为阳性对照。奥美拉唑给药会产生不良反应，成本也较高。而美沙拉嗪通过抗氧化机制发挥胃保护作用，表明单独或联合治疗时，美沙拉嗪有可能缓解胃酸相关疾病。

4 结论

美沙拉嗪通过抑制氧化损伤、刺激 PGE_2 产生和抑制 NF-κB 活化，可有效保护乙醇所致大鼠 GU。

参考文献：

[1] Ramadan A, Afifi N, Yassin NZ, *et al*. Mesalazine, an osteopontin inhibitor: the potential prophylactic and remedial roles in induced liver fibrosis in rats[J]. Chem Biol Interact, 2018, 289: 109-118.

[2] 朱思莹, 韩牧洲, 范李侨娜, 等. 美沙拉秦依从性在溃疡性结肠炎治疗达标中的作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(18): 1959-1963.

[3] Faramarzian M, Bahramikia S, Dehghan Shasaltaneh M. *In vitro* investigation of the effect of mesalazine on amyloid fibril formation of hen egg-white lysozyme and defibrillation lysozyme fibrils[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 5: 874.

[4] 邹永, 范振鑫, 魏日凤, 等. 柳叶蜡梅醇提物对无水乙醇致大鼠急性胃黏膜损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 294-300.

[5] 蒋林哲, 王月华, 王立波, 等. 实时荧光定量PCR检测结肠癌中HER2和TOPOⅡα mRNA的表达[J]. 现代医学, 2020, 48(1): 26-30.

[6] 刘广宁, 门炜. 白果内酯通过NLRP3相关通路发挥对乙醇致大鼠胃溃疡的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2022, 30(2): 77-87.

[7] Beiranvand M. A review of the biological and pharmacological activities of mesalazine or 5-aminosalicylic acid(5-ASA): an anti-ulcer and anti-oxidant drug[J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(5): 1279-1290.

[8] Park H, Kim W, Kim D, *et al*. Mesalazine activates adenosine monophosphate-activated protein kinase: implication in the anti-inflammatory activity of this anti-colitic drug[J]. Curr Mol Pharmacol, 2019, 12(4): 272-280.

[9] 严思思, 丁锦丽, 杨菁. 核转录因子-κB及其调控因子在多囊卵巢综合征中的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(9): 1244-1247.

[12] Song JW, Seo CS, Kim TI, *et al*. Protective effects of manassantin a against ethanol-induced gastric injury in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2016, 39(2): 221-229.

[13] Yoo JH, Lee JS, Lee YS, *et al*. Protective effect of bovine milk against HCl and ethanol- induced gastric ulcer in mice[J]. J Dair Sci, 2018, 101(5): 3758-3770.

[14] Cho BO, Yin HH, Park SH, *et al*. Anti-inflammatory activity of myricetin from *Diospyros lotus* through suppression of NF-κB and STAT1 activation and Nrf2-mediated HO-1 induction in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(8): 1520-1530.

（编辑：沈　盈）