

2(3)-叔丁基-4-羟基茴香醚对乙醇诱发大鼠胃粘膜损伤的保护作用

王立新*, 林三仁

(北京医科大学消化疾病研究中心, 北京 100083)

摘要 目的:研究叔丁基-4-羟基茴香醚(BHA)对乙醇诱发胃粘膜损伤的保护作用。方法:通过给大鼠 ig 无水乙醇制备胃粘膜损伤模型,测定胃粘膜内一些酶的活性和 MDA 含量。结果:ig BHA 20 和 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 连续 3 d, 能显著防止乙醇诱发的胃粘膜损伤,并降低由乙醇所致的 MDA 含量增加。BHA 有诱导醌还原酶、谷胱甘肽还原酶活性增加的作用,且能阻止由乙醇引起的醌还原酶、谷胱甘肽还原酶和 SOD 活性的降低。结论:BHA 对乙醇诱发大鼠胃粘膜损伤有保护作用,其作用机制可能与 BHA 诱导抗氧化酶活性增高和抗脂质过氧化作用有关。

关键词 2(3)-叔丁基-4-羟基茴香醚;胃粘膜损伤;胃保护;抗氧化作用

随着对溃疡病研究的深入,近年来发现体内某些内源性介质,特别是氧自由基在粘膜损伤及溃疡的发病机制中占有重要地位,如何提高机体粘膜自身的抗氧化能力,及减弱或消除外来有害物质对粘膜的氧化损伤,成为进一步寻找抗消化性溃疡病药物的重要手段之一^[1]。叔丁基羟基茴香醚[2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole, BHA]做为抗氧化剂,长期以来用作食品添加剂。文献报道 BHA 有抗 CCl_4 、醋氨酚、乙醇和阿霉素等诱发的实验性肝或心肌损伤的作用^[2~4],其抗氧化损伤的机制可能在于 BHA 是 II 相酶的诱导剂,能诱导组织醌还原酶 [NAD(P)H:quinone reductase, QR]、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferases, GSTs)等细胞保护酶的活性增高。因此本文拟探讨抗氧化剂 BHA 对乙醇诱发的实验性胃粘膜损伤的保护作用及其抗氧化损伤机制。

材 料 和 方 法

试剂 β -NADP⁺, G-6-P, 黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)、噻唑蓝(Thiazolyl blue, MTT)、NADPH、GSH、黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶和 BHA 均购自 Sigma 公司,其它试剂均为分析纯或优级纯。

动物及分组 体重 180~210 g δ Wistar 大鼠分为以下各组,每组 6 只:生理盐水对照组, BHA 5

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 乙醇组, BHA 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 乙醇组, BHA 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 乙醇组和乙醇组,及单给 BHA 5, 20 和 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,上述剂量的 BHA ig qd, 共 3 次。实验前大鼠禁食 18 h, 自由饮水。于 d 3 ig 无水乙醇前 2 h 给 BHA 1 次,对照组仅给生理盐水。

胃粘膜损伤指数测定 体重每 200 g 给无水乙醇 1 ml ig, 60 min 后处死动物,立即取胃,测定粘膜损伤长度(mm)后放入液氮速冻保存。以粘膜损伤长度做为损伤指数。

醌还原酶活性测定 胃粘膜匀浆液制备参照文献^[5]进行。醌还原酶(QR)反应液 25 ml 中^[6]含 Tris-HCl 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, FAD 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, G-6-P 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tween-20 0.1%, 甲萘醌 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NADP⁺ 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, G-6-PDH 50 U, 牛血清白蛋白 16.7 mg 和 MTT 7.5 mg。加入待测胃粘膜匀浆液后在 96 孔酶联仪(美国 Molecular Devices 公司产品)上读取 610 nm 处吸光度每分钟的变化值。胃粘膜匀浆液的蛋白含量用双缩脲法测定。

谷胱甘肽还原酶测定 在 GSH 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 存在下以 NADPH 氧化反应速度表示。

MDA 含量测定 以四乙氧基丙烷为标准测定胃粘膜匀浆液中脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量。

SOD 活性测定 用亚硝酸盐形成法,以抑制亚硝酸盐形成 50% 所需酶量定义为一个 SOD 亚硝酸盐活性单位(NU)。

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

结 果

1 BHA对乙醇诱发大鼠胃粘膜损伤的保护作用

灌服无水乙醇 1 h 后,可以发现对照大鼠胃粘膜严重损伤,损伤指数为(72.8 ± 16.7) mm,经用 BHA 100 mg·kg⁻¹和 20 mg·kg⁻¹ BHA 预处理的大

鼠,粘膜损伤指数降低为(15.5 ± 7.18) mm 和 (28.3 ± 10.9) mm,与乙醇对照相比,分别降低了 78.7%和 61.1%,表现为 BHA 对乙醇诱发大鼠胃粘膜的损伤有显著保护作用,如表 1 所示。但用 BHA 5 mg·kg⁻¹预先处理的大鼠对乙醇诱发的损伤无保护作用,表明 BHA 的抗乙醇损伤作用有剂量依从关系。

Tab 1 Protection and anti-lipid peroxidation of BHA given ig on ethanol-induced gastric injury in rats

Group	Dose of BHA / mg·kg ⁻¹ ig × 3 d	Lesion index / mm	MDA / nmol·mg ⁻¹ protein
Normal control	-	0	5.20 ± 0.877
Ethanol	-	72.8 ± 16.7	6.85 ± 0.749 ^{△△}
BHA + ethanol	5	50.7 ± 13.8	5.56 ± 1.18
	20	28.3 ± 10.9 ^{***}	4.44 ± 0.938 ^{**}
	100	15.5 ± 7.18 ^{****}	3.34 ± 0.264 ^{****}

$n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$, ^{****} $P < 0.0001$ vs ethanol.

^{△△} $P < 0.01$ vs normal control.

2 BHA对胃粘膜的抗脂质过氧化作用

由表 1 可知,酒精造成胃粘膜的脂质过氧化作用增强,使其产物 MDA 含量较正常对照显著增加,如果预先服用 BHA 100 mg·kg⁻¹和 20 mg·kg⁻¹,则能显著降低由乙醇所引起的 MDA 含量的增加。另外我们单用不同剂量的 BHA 预处理大鼠,发现 100 mg·kg⁻¹ BHA 剂量组,本身有明显降低胃粘膜的脂质过氧化作用,其胃粘膜 MDA 含量较正常对照显著降低(表 2),表明 BHA 有很强的抗胃粘膜脂质过氧化作用。

Tab 2 Effect of BHA ig on MDA content in rat gastric mucosa

Group	Dosage / mg·kg ⁻¹ ig × 3 d	MDA / nmol·mg ⁻¹ protein
Normal control	-	5.20 ± 0.877
BHA	5	4.78 ± 0.709
	20	4.50 ± 1.02
	100	3.06 ± 0.379 ^{△△}

$n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{△△} $P < 0.01$ vs normal control.

3 BHA对胃粘膜 QR,GR 和 SOD活性的影响

在正常情况下,胃粘膜 QR 的活性很高,为每毫克蛋白(1472 ± 179) nmol·L⁻¹,ig BHA 100 mg·kg⁻¹和 20 mg·kg⁻¹能显著诱导胃粘膜 QR 活性增加,达到每毫克蛋白(2009 ± 203) nmol·L⁻¹和(1871 ± 273) nmol·L⁻¹(表 3)。在乙醇诱导的胃粘膜损伤中,QR 活性则显著降低,每 mg 蛋白只有 966 ± 122 nmol·L⁻¹,表明乙醇能够破坏胃粘膜正常的清除自由基系统。但 BHA 经 100 mg·kg⁻¹和 20 mg·kg⁻¹预处理的大鼠,胃粘膜的 QR 活性较乙醇对照组显著增加,如表 4 所示。

由表 3 和表 4 可见,BHA 100 mg·kg⁻¹和 20 mg·kg⁻¹均能诱导胃粘膜 GR 活性显著增加,而乙醇则导致胃粘膜 GR 含量降低($P < 0.05$)。但 ig BHA 100 mg·kg⁻¹和 20 mg·kg⁻¹后均有防止乙醇所致 GR 活性降低的作用。BHA 小剂量(5 mg·kg⁻¹)对胃粘膜 GR 的活性影响不大。

SOD 是胃粘膜重要的抗氧化酶之一,可以观察到给大鼠乙醇灌胃后能够显著降低胃粘膜 SOD 的含量。尽管 BHA 给药 3 d 对胃粘膜 SOD 的含量影响不大,但 100 mg·kg⁻¹和 20 mg·kg⁻¹则能阻止乙醇导致胃粘膜 SOD 含量的降低(表 3,表 4)。

Tab 3 BHA induction of quinone reductase(QR) , glutathion reductase(GR) and SOD in rat gastric mucosa

Group	Dosage	QR	GR	SOD
	/ mg•kg ⁻¹ ig × 3 d	/ nmol•min ⁻¹ •mg ⁻¹ protein		/ NU•mg ⁻¹ protein
Normal control	-	1472 ± 179	95.1 ± 8.14	8.42 ± 0.126
BHA	5	1687 ± 186	96.5 ± 9.31	8.54 ± 0.180
	20	1871 ± 273 [△]	106 ± 6.51 [△]	8.44 ± 0.137
	100	2009 ± 203 ^{△△△}	116 ± 9.07 ^{△△}	8.52 ± 0.413

n = 6, $\bar{x} \pm s$. [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01, ^{△△△} P < 0.001 vs normal control.

Tab 4 Effect of BHA on quinone reductase(QR) , glutathion reductase(GR) and SOD in rat gastric mucosa injured by ethanol

Group	Dosage	QR	GR	SOD
	/ mg•kg ⁻¹ ig × 3 d	/ nmol•min ⁻¹ •mg ⁻¹ protein		/ NU•mg ⁻¹ protein
Normal control	-	1472 ± 179	95.1 ± 8.14	8.42 ± 0.126
Ethanol	-	966 ± 122 [△]	81.3 ± 10.6 [△]	7.15 ± 0.462 ^{△△}
BHA	5	1142 ± 184	85.5 ± 10.1	7.85 ± 0.248
	20	1349 ± 382 [*]	95.3 ± 9.18 [*]	8.23 ± 0.437 [*]
	100	1332 ± 335 [*]	96.6 ± 9.65 [*]	8.32 ± 0.487 ^{**}

n = 6, $\bar{x} \pm s$. ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01 vs ethanol. [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01 vs normal control.

讨 论

给大鼠灌服无水乙醇, 1 h 后发现胃粘膜严重损伤, 损伤指数达(72.8 ± 16.7) mm, 同时胃粘膜脂质过氧化产物 MDA 较正常对照显著升高, 表明乙醇对胃粘膜有很强的脂质过氧化损伤作用, 这与文献报道^[7]乙醇可通过活性自由基的链式反应损伤胃粘膜的机制一致。结果表明抗氧化剂 BHA 对乙醇诱发大鼠胃粘膜的损伤有很强的保护作用, 经 BHA 预处理的大鼠, 粘膜损伤指数显著降低。我们发现 BHA 有很强的抗胃粘膜脂质过氧化作用, BHA 100 mg•kg⁻¹ 能够显著降低胃粘膜 MDA 的含量(P < 0.01), 并降低由乙醇所引起的 MDA 含量的增加, 提示 BHA 显著的抗脂质过氧化作用是其保护胃粘膜的机制之一。

BHA 的抗脂质过氧化作用与其诱导一些抗氧化酶的活性增高有关。已知 BHA 是 II 相酶的单功能诱导剂, 对醌还原酶(QR)、谷胱甘肽-S 转移酶(GSTs) 等酶有诱导作用, 这些酶绝大部分涉及对自由基的清除, 以及对有害物质的解毒过程。醌类物质广泛存在于自然界(包括人们的饮食)中, 它们在细胞微粒体 NADPH 细胞色素 P450 氧化还原酶的催化下, 进行单电子还原, 形成半醌自由基, 半醌自由基极不稳定, 与氧分子反应形成超氧阴离子。羟自由基和单线态氧, 这一系列反应产生的活性氧最终

将导致细胞的损伤或死亡, 或形成溃疡。而醌还原酶能催化醌类进行两电子的还原使醌形成氢醌, 氢醌是一种相对稳定的化合物, 易与硫酸盐或葡糖醛酸结合排出体外, 因此中断醌类物质的氧化还原链式反应, 减少或阻止自由基的产生。从醌还原酶在正常脏器组织的分布情况看, 以腺胃组织活性最高^[8,9], 这可能与腺胃密切接触食物中的醌类物质, 防止它们对正常粘膜的氧化损伤有重要意义。本研究观察到在酒精诱发大鼠胃粘膜损伤的同时导致胃粘膜内 QR 活性明显降低, 而预先给与 II 相酶的诱导剂 BHA 后则可显著增加胃粘膜内 QR 的含量, 并预防由乙醇造成的胃粘膜损伤。因此胃的 QR 在保护自身粘膜结构的完整性及在对抗自由基的氧化损伤方面有重要作用。

本研究结果表明 BHA 对胃粘膜谷胱甘肽还原酶(GR) 有诱导作用, 使 GR 活性增高。尽管 BHA 对胃粘膜的超氧化物歧化酶(SOD) 诱导作用不明显, 但可阻止由乙醇所致胃粘膜 SOD 含量的降低。谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶均是体内重要的抗氧化酶, GR 可以使氧化型谷胱甘肽转变为还原型谷胱甘肽(GSH), 并能维持膜及蛋白的稳定性, 防止脂质过氧化损伤, 而 GSH 是胃保护的一个重要因素; SOD 则能直接清除超氧阴离子, 许多研究已证实 SOD 对实验性胃粘膜损伤有明显的抗氧化损伤作用, 因此 BHA 诱导 QR 和 GR, 并与 SOD 协同作用, 表现了对乙醇诱发胃粘膜损伤的显著抗氧化损伤作

用。

抗氧化剂在防治溃疡病的药物应用中有重要作用。尽管 SOD 的抗氧化损伤作用明显,但由于其在体内半衰期极短,且是大分子物质,较难透过细胞膜,因此影响其治疗效果,临床应用受到限制。BHA 通过增强自身的抗氧化酶活性和抗脂质过氧化作用,显示较强的抗氧化损伤能力,此结果为寻找新的抗溃疡病药物提供了实验依据。

参 考 文 献

- 1 Ligumsky M, Sestieri M, Okon E, *et al.* Antioxidants inhibit ethanol-induced gastric injury in the rat: role of manganese, glycine, and carotene. *Scand J Gastroenterol*, 1995, **30**: 854
- 2 Chung JH, Cha YN, Rubin RJ. Role of quinone reductase in *in vivo* ethanol metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, **124**: 123
- 3 Ansher SS, Dolan P, Bueding E. Chemoprotective effects of two dithiolthiones and of butylhydroxyanisole against

- carbon tetrachloride and acetaminophen toxicity. *Hepatology*, 1983, **3**: 932
- 4 王立新,林三仁. 2(3)-叔丁基-4-羟基茴香醚对阿霉素诱发小鼠毒性的保护作用及其抗氧化机制. *药学报*, 1998, **33**: 807
 - 5 Gerhauser C, You M, Liu JF, *et al.* Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res*, 1997, **57**: 272
 - 6 Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem*, 1989, **169**: 328
 - 7 Nordman R, Ribiere C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad Biol Med*, 1992, **12**: 219
 - 8 王立新,林三仁. 延胡索酸二甲酯对大鼠醌还原酶和谷胱甘肽-S-转移酶的诱导作用及其意义. *中华预防医学杂志*, 待发表
 - 9 Belinsky M, Jaiswal AK. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase₁ (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev*, 1993, **12**: 103

PROTECTION AND ANTI-OXIDATIVE MECHANISM OF 2(3)-TERT-BUTYL-4-HYDROXYANISOLE AGAINST ETHANOL INDUCED GASTRIC LESION IN RATS

Wang Lixin(Wang LX) , Lin Sanren(Lin SR)

(Digestive Diseases Research Center , Beijing Medical University , Beijing 100083)

ABSTRACT **AIM:** The protection and anti-oxidative mechanism of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) against ethanol-induced gastric mucosa lesion in rats were evaluated. **METHODS:** Gastric mucosal lesions were induced by oral administration of absolute ethanol in rats. The activities of some enzymes and MDA content in gastric mucosa were determined. **RESULTS:** Oral administration of BHA at $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ reduced significantly the gastric lesion induced by ethanol, and inhibited the increase of MDA in gastric mucosa. Compared with normal control, BHA was found to increase the activities of quinone reductase (QR) and glutathione reductase (GR). In ethanol-treated rats decreases of QR, GR and SOD were observed. However, BHA was shown to prevent the decrease of QR, GR and SOD in gastric mucosa induced by ethanol. **CONCLUSION:** These results suggest that BHA has protective effect against ethanol-induced gastric mucosal lesion via increasing the activities of anti-oxidative enzymes and anti-lipid peroxidation.

KEY WORDS 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole; gastric mucosa injury; gastroprotection; anti-oxidation