

## 美洲大蠊提取物 Ento-A 对大鼠急性胃炎胃黏膜的保护作用

肖克云<sup>1</sup>, 张晶娜<sup>1</sup>, 王斌<sup>2</sup>, 段银祥<sup>2</sup>, 余万鑫<sup>1</sup>, 李玥<sup>1</sup>, 刘衡<sup>1\*</sup>(1.大理大学, 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心, 云南 大理 671000; 2.大理大学第一附属医院, 云南 大理 671000)

**摘要:** 目的 研究美洲大蠊提取物 Ento-A 对急性胃炎胃黏膜的保护作用及其初步作用机制。方法 将大鼠分为正常对照组, 模型对照组, 康复新液组, 西咪替丁组, 美洲大蠊提取物 Ento-A 高、低剂量组, 连续给药 8 d 后, 采用 80%乙醇与 20 mg·mL<sup>-1</sup>水杨酸钠溶液等体积混合后灌胃建立胃黏膜损伤模型, 以胃炎发生计分及病理组织学评分评价 Ento-A 对胃黏膜的保护作用; 酶联免疫法检测大鼠血清中丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、超氧化物歧化酶(SOD)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及胃组织匀浆中表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)的表达水平, 探究 Ento-A 对胃黏膜的保护作用机制。结果 与模型对照组比较, 康复新液、西咪替丁及 Ento-A 能显著降低急性胃炎大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、MDA、IL-1 $\beta$  和升高 SOD 的表达水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 并能提高大鼠急性胃炎胃组织匀浆中 EGF 的表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 美洲大蠊提取物 Ento-A 具有明显的胃黏膜损伤保护作用, 其机制可能与减少炎症因子分泌, 抗自由基损伤及促进组织修复有关。

**关键词:** 美洲大蠊; Ento-A; 急性胃炎; 康复新液

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)05-0564-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.05.009

引用本文: 肖克云, 张晶娜, 王斌, 等. 美洲大蠊提取物 Ento-A 对大鼠急性胃炎胃黏膜的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(5): 564-568.

### Protective Effect of Ento-A Extract of *Periplaneta Americana* on Gastric Mucosa in Rats with Acute Gastritis

XIAO Keyun<sup>1</sup>, ZHANG Jingna<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>2</sup>, DUAN Yinxiang<sup>2</sup>, YU Wanxin<sup>1</sup>, LI Yue<sup>1</sup>, LIU Heng<sup>1\*</sup>(1.Dali University, Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, National Local Joint Engineering Research Center for the Development of Medicinal Special Insects, Dali 671000, China; 2.The First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the protective effect of Ento-A extract from *Periplaneta americana* on gastric mucosa of acute gastritis and to explore its mechanism. **METHODS** Rats were divided into normal control group, model control group, Kangfuxin liquid group, cimetidine group, Ento-A high and low dose group. After 8 days of continuous administration, the model of gastric mucosal injury was established by intragastric administration with 20 mg·mL<sup>-1</sup> sodium salicylate solution and 80% ethanol. The protective effect of Ento-A extract on the gastric mucosa was evaluated by gastritis scoring and histopathological scoring. The expression levels of MDA, TNF- $\alpha$ , SOD, IL-1 $\beta$  in serum and epidermal growth factor(EGF) in gastric tissue homogenate of rats were detected by ELISA to investigate the protective mechanism of Ento-A on gastric mucosa. **RESULTS** Compared with the model control group, Kangfuxin liquid, cimetidine and Ento-A could significantly reduce the expression of TNF- $\alpha$ , MDA, IL-1 $\beta$ , and increase the level of SOD in the serum of rats with acute gastritis( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), increase the expression of EGF in the gastric homogenate of rats with acute gastritis( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **CONCLUSION** Ento-A has obvious protective effect on gastric mucosal injury, and its mechanism may be related to reducing the secretion of inflammatory factors, resisting free radical damage and promoting tissue repair.

**KEYWORDS:** *Periplaneta americana*; Ento-A; acute gastritis; Kangfuxin liquid

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81660605, 81860742, 81860765); 云南省地方本科高校(部分)基础研究联合专项(2017FH001-108); 云南省教育厅科学研究基金产业化培育项目(2016CYH15)

**作者简介:** 肖克云, 男 Tel: 17586513493 E-mail: 3075164800@qq.com \*通信作者: 刘衡, 男, 硕士, 副研究员 Tel: (0872)2214251 E-mail: lheng125@126.com

急性胃炎系由不同病因引起的胃黏膜急性炎症, 主要症状为胃部水肿、出血、溃疡等<sup>[1]</sup>, 其主要病变为胃黏膜层, 严重者可累及黏膜下层及肌层。美洲大蠊(*Periplaneta americana* L.) 俗称蟑螂, 具有增强免疫、促进血管增生、组织修复、抗炎消肿等作用<sup>[2]</sup>。以美洲大蠊为原料制成的康复新液对酒精性胃黏膜损伤具有明显的保护作用<sup>[3]</sup>。本实验采用 80%乙醇与 20 mg·mL<sup>-1</sup>水杨酸钠溶液等体积混合灌胃建立大鼠急性胃炎模型, 考察新工艺制备的美洲大蠊提取物 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃黏膜的保护作用及其机制, 为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 动物

48 只成年健康 Wistar 大鼠, ♂, 体质量 250~300 g, SPF 级, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(辽)2015-0001。饲养条件: 清洁级, 室温 16~22 °C, 相对湿度 60%, 12 h 明暗交替, 自由进食、饮水。

### 1.2 药物与试剂

美洲大蠊提取物 Ento-A(大理大学昆虫生物医药研究院提供, 批号: 20160901); 西咪替丁(昆药集团股份有限公司, 批号: 171003-6); 康复新液(四川好医师攀西药业股份有限公司, 批号: 13170705); 无水乙醇(天津市福晨化学试剂厂, 批号: 20160312); 水杨酸钠(广东汕头市西陇化工厂, 批号: 0210151); 大鼠 ELISA 试剂盒: 超氧化物歧化酶(SOD, 批号: 20180203)、丙二醛(MDA, 批号: 201802010)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ , 批号: 20180203)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ , 批号: 20180201)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF, 批号: 20180205)均购自南京建成生物工程研究所; 氯化钠注射液(贵州天地药业有限责任公司, 批号: A15022001)。

### 1.3 仪器

TL-16R 型台式冷冻离心机(上海离心机机械研究所); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用有限公司); ML204/02 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 201 型酶标仪(奥地利安图斯公司); VORTEX-5 型涡旋仪(海门市其林贝尔制造有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 美洲大蠊提取物 Ento-A 的制备

美洲大蠊药材 5 kg, 粉碎, 过 20 目筛, 加水

50 L, 室温浸泡过夜, 在 95 °C 下回流提取 3 次, 每次 3 h。收集提取液, 过滤, 浓缩至相对密度为 1.10~1.20; 加入 95%乙醇, 调节含醇量至 50%~70%, 搅拌 30 min, 静置 48 h, 过滤, 回收乙醇, 浓缩至相对密度为 1.05~1.10, 冷藏库放置 24 h, 弃去上层油脂, 下层溶液过滤, 滤液减压浓缩至稠膏, 即得美洲大蠊提取物 Ento-A。

### 2.2 分组给药及造模方法

将 48 只大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、西咪替丁组(100 mg·kg<sup>-1</sup>)、康复新液组(3 mL·kg<sup>-1</sup>)、美洲大蠊提取物 Ento-A 低剂量组(150 mL·kg<sup>-1</sup>)和高剂量组(300 mL·kg<sup>-1</sup>), 共 6 组, 每组 8 只。正常对照组与模型对照组均灌胃给予生理水(3 mL·kg<sup>-1</sup>), 其余各组大鼠分别灌胃给予相应的药物, 连续给药 8 d, 每天 1 次, 末次给药前 24 h, 禁食不禁水。末次给药 90 min 后, 除正常对照组外均灌胃给予 80%乙醇与 20 mg·mL<sup>-1</sup>水杨酸钠溶液的等体积混合液(0.1 mL·kg<sup>-1</sup>), 正常对照组以生理盐水代替造模剂平行操作。

### 2.3 动物的处理

造模 1 h 后, 10%水合氯醛麻醉大鼠, 解剖, 腹主动脉采血, 于 4 °C 静置 4 h, 3 500 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 取上层血清, 按试剂盒说明书检测血清中 SOD、TNF- $\alpha$ 、MDA、IL-1 $\beta$  的含量。摘胃, 沿胃大弯剪开胃壁, 用生理盐水清洗胃内容物, 观察胃炎发生情况, 胃炎发生记分<sup>[4-5]</sup>: 无胃炎发生 0 分; 局部、轻度炎症 1 分; 严重充血、局部炎症明显 2 分; 全胃弥漫性炎症变化 3 分。将胃组织横向剪取一半称重, 制成 10%组织匀浆液, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液检测 EGF 的含量, 另一半胃组织用 4%甲醛溶液固定后, 石蜡包埋, 制作病理切片, 在光学显微镜下观察胃黏膜损伤情况, 损伤程度进行积分判定: 正常 0 分; 表层上皮损伤 1 分; 上层黏膜充血或水肿 2 分; 中或下层黏膜充血、水肿或出血 3 分; 黏膜上层腺体结构紊乱或坏死 4 分; 有深层的坏死或溃疡 5 分。每一标本累计组织学积分, 最高为 15 分<sup>[6]</sup>。

### 2.4 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并用 SPSS 17.0 软件对各组数据进行统计分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有显著性意义。根据数据处理结果, 采用 GraphPad Prism 5 软件制图。

### 3 结果

#### 3.1 美洲大蠊提取物 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃炎发生计分的影响

与正常对照组比较,模型对照组的胃炎发生计分显著升高( $P<0.01$ );与模型对照组比较,西咪替丁组、康复新液组、美洲大蠊提取物 Ento-A 各剂量组的胃炎发生计分明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结果见图 1。

#### 3.2 美洲大蠊提取物 Ento-A 对急性胃炎大鼠血清生化指标的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠血清中 SOD 的含量显著降低( $P<0.05$ ),MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的含量显著升高( $P<0.01$ )。与模型对照组比较,康复新液组、西咪替丁组及美洲大蠊提取物 Ento-A 各剂量组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、MDA、IL-1 $\beta$  的含量显著降低( $P<0.01$ )和 SOD 的含量显著升高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。结果见图 2。

#### 3.3 美洲大蠊提取物 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃组织相关指标的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠胃组织

中 EGF 的含量显著降低( $P<0.01$ );与模型对照组比较,西咪替丁组、康复新液组、美洲大蠊提取物 Ento-A 各剂量组大鼠胃组织中 EGF 的含量显著升高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ),且美洲大蠊提取物 Ento-A 低剂量对 EGF 的作用与西咪替丁相当。结果见图 3。

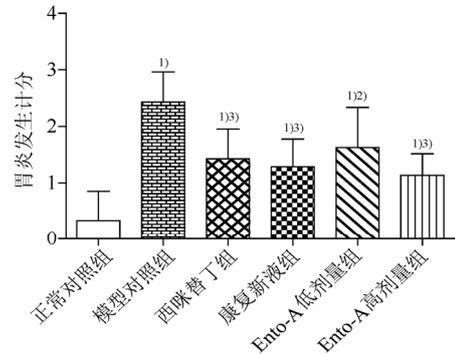


图 1 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃炎发生计分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effect of Ento-A on scoring of gastritis in rats with acute gastritis ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model control group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .

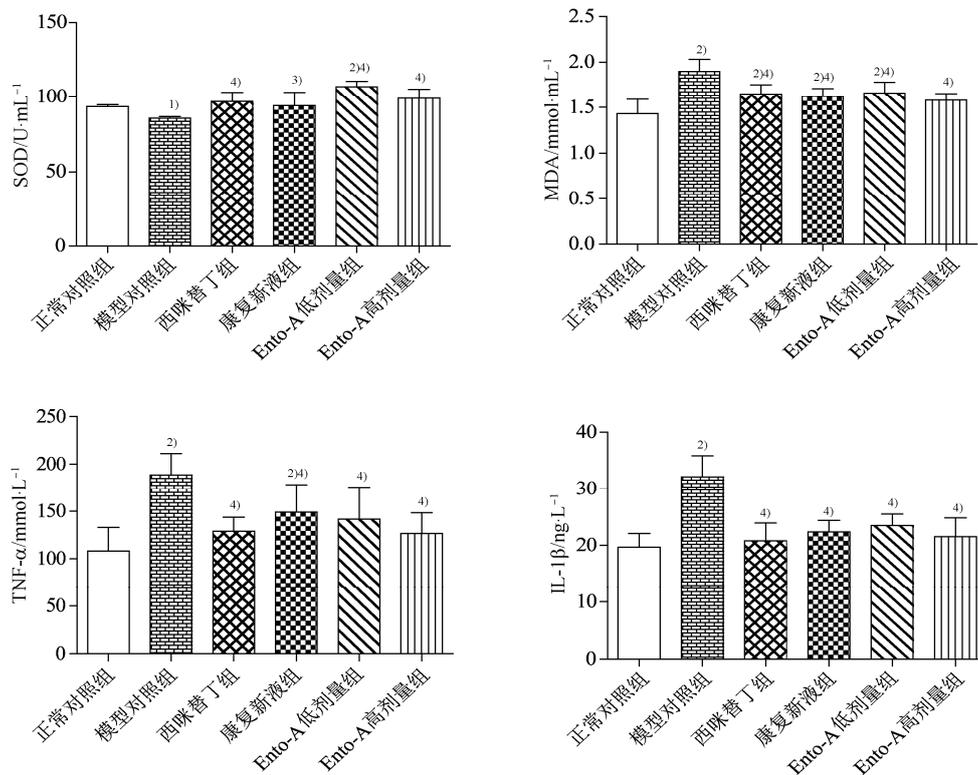


图 2 Ento-A 对急性胃炎大鼠血清生化指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effects of Ento-A on serum biochemical indexes in rats with acute gastritis ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model control group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ .

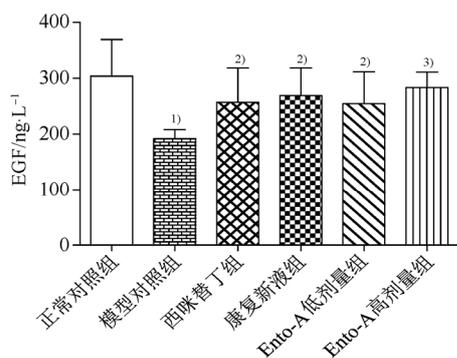


图 3 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃组织相关指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of Ento-A on gastric tissue parameters in rats with acute gastritis ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model control group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .

### 3.4 美洲大蠊提取物 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃组织的影响

正常对照组胃组织表层上皮无损伤, 上层黏膜未见充血或水肿, 胃黏膜层次清晰, 腺体排列整齐; 模型对照组表层上皮损伤严重, 上层黏膜大量红细胞聚集, 有中或下层黏膜充血, 黏膜上层腺体结构紊乱或坏死等; 各给药组与模型对照组比较均有不同程度的改善。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠胃组织病理总计分显著升高 ( $P<0.01$ )。与模型对照组比较, 西咪替丁组、康复新液组、美洲大蠊提取物 Ento-A 各剂量组大鼠胃组织的病理评分显著降低 ( $P<0.01$ )。结果见图 4~5。

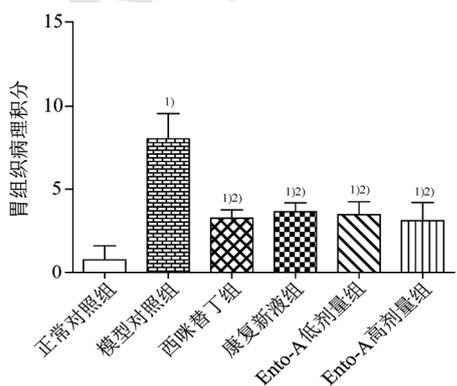


图 4 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃组织病理学评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of Ento-A on gastric histopathological score in rats with acute gastritis ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model control group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

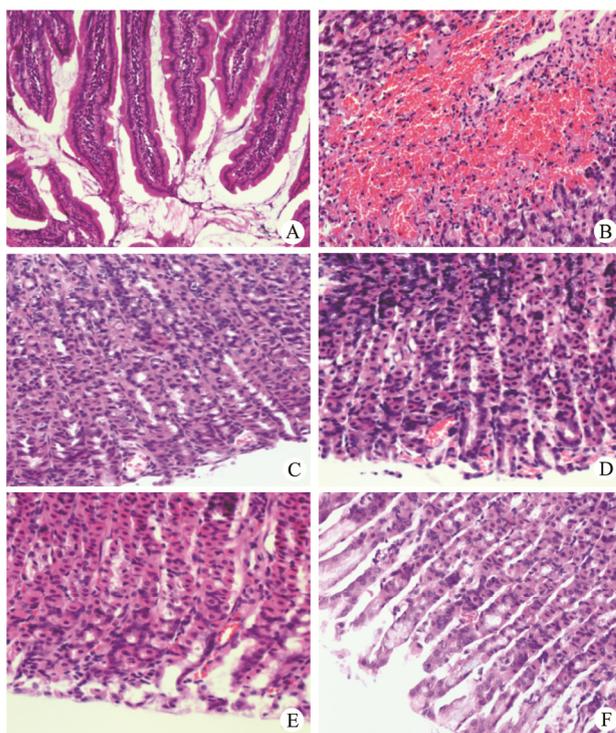


图 5 Ento-A 对急性胃炎大鼠胃组织病理学的影响(HE, 400 $\times$ )

A-正常对照组; B-模型对照组; C-西咪替丁组; D-康复新液组; E-Ento-A 低剂量组; F-Ento-A 高剂量组。

Fig. 5 Effect of Ento-A on gastric histopathology in rats with acute gastritis(HE, 400 $\times$ )

A-normal control group; B-model control group; C-cimetidine group; D-Kangfuxin group; E-Ento-A low dose group; F-Ento-A high dose group.

## 4 讨论

本实验采用 80%乙醇溶液与 20 mg·mL<sup>-1</sup>水杨酸钠等体积混合溶液建立大鼠急性胃炎模型。水杨酸钠直接刺激局部的胃黏膜引起炎症反应, 胃黏膜细胞剥脱, 抑制胃黏膜生长使其失去正常的抵抗力, 同时抑制前列腺素的合成<sup>[7]</sup>。高浓度的乙醇直接引起胃黏膜上皮细胞的变性坏死, 破坏黏膜防御系统, 使胃肠黏膜极易遭受胃酸、各类消化酶的侵袭, 进而引起黏膜的损伤<sup>[8]</sup>。病理组织学结果显示, 模型对照组大鼠胃组织表层上皮损伤严重, 上层黏膜大量红细胞聚集, 有中或下层黏膜充血, 黏膜上层腺体结构紊乱或坏死等现象, 提示急性胃炎胃黏膜损伤模型复制成功。据文献报道<sup>[9]</sup>, 康复新液和临床常用黏膜保护剂达喜、必奇对急性酒精性胃黏膜损伤有同样的保护作用。本研究结果显示, 康复新液能够降低炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达, 升高 EGF 的表达, 其结果与文献报道一致, 可能与康复新液消炎、促进创

面修复的临床功效相关。

IL-1 $\beta$  是一种炎性活细胞素,可刺激各种免疫细胞和炎症细胞,促进炎症蛋白和炎症介质的释放,对中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞有趋化作用,增强炎症反应<sup>[10]</sup>。TNF- $\alpha$  是由巨噬细胞、单核细胞经致炎因子刺激后所释放的一种细胞因子,可促进中性粒细胞聚集活化,增加其吞噬能力,刺激细胞分泌过氧化物,进而造成细胞死亡和组织损伤<sup>[11]</sup>。SOD 是自由基清除防御系统最重要的标志酶之一,可在一定程度上反映机体清除自由基能力的大小<sup>[12]</sup>。在炎症过程中,脂质过氧化反应的产物 MDA 可使组织释放大量炎症介质、破坏组织细胞结构。MDA 可反映体内脂质过氧化的程度,并间接反映机体细胞受氧自由基攻击的严重性,进而反映细胞损害程度<sup>[13]</sup>。本研究中,经美洲大蠊提取物 Ento-A 治疗后,大鼠 SOD 水平升高,IL-1 $\beta$ 、MDA、TNF- $\alpha$  水平降低,提示美洲大蠊提取物 Ento-A 可能通过抑制炎症因子的表达,调节机体活性氧的形成和抗氧化系统的平衡,从而减轻胃组织的损伤程度。EGF 是一种胃肠道营养多肽,它能够促进胃肠黏膜上皮细胞增生,改善胃黏膜血循环和增强黏膜屏障,显著抑制胃酸的分泌<sup>[14]</sup>。本研究中,经美洲大蠊提取物 Ento-A 治疗后 EGF 水平显著升高,提示美洲大蠊提取物 Ento-A 可通过促进黏膜损伤修复,减轻胃组织的损伤。

综上所述,Ento-A 作为新工艺制备的美洲大蠊提取物与市售康复新液对急性胃炎胃黏膜均具有明显的保护作用,其机制可能与降低促炎因子表达、抗氧化、修复损伤胃黏膜等有关。

## REFERENCES

- [1] MEI H H, MEI J. Jianwei Zhitong Mixture on expression of the NO and IL-1 in gastric tissues of rats with atrophic [J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志), 2015, 10(11): 1523-1525.
- [2] ZHANG H C, WANG P C, LIU H, et al. Effect of Kangfuxin

on ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2018, 34(4): 496-501.

- [3] HONG Y, ZHOU X Q, CUI L, et al. Protection of Kangfuxin liquid on acute alcoholic gastric mucosal injury in rats [J]. West China J Pharm Sci(华西药科学杂志), 2008, 22(5): 620-621.
- [4] 谢秀琼. 中药制剂开发与应用[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [5] 朱愉, 多秀瀛. 实验动物疾病模型[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1997.
- [6] GUO Z M, LIU L N, LI C Y, et al. An assessment of the effect of nitric oxide on ethanol induced gastritis mucosa in rats and its relation to mast cells(abstract) [J]. J Dalian Med Univ(大连医科大学学报), 1997, 37(4): 15-19.
- [7] ZHANG S Q, ZHAO L S, ZHEN JK, et al. Reproducing of animal model on the chronic atrophic gastritis [J]. Nat Sci J Harbin Norm Univ(哈尔滨师范大学自然科学学报), 2001, 38(6): 81-83.
- [8] LUO X, WEI W, YU M Y, et al. The gastric protective effects of Morchella conica on the ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats [J]. Mycosystema(菌物学报), 2011, 30(2): 319-324.
- [9] 洪阳, 周晓倩, 崔蕾, 等. 康复新与临床常用黏膜保护剂对实验性大鼠酒精性胃黏膜损伤保护作用的观察[C]. 2008年贵州省医学会消化及内镜学会学术大会论文集汇编. 2008.
- [10] JIANG Y, SONG C Y, WANG G Z, et al. Study of the correlation of iNOS, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in gastric mucosa tissues in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis [J]. J Bengbu Med Coll(蚌埠医学院学报), 2012, 37(5): 556-558.
- [11] ZHANG J, WEI Y K, LI Y, et al. Effects and mechanism of *Periplaneta americana* extracted Ento-D on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33(1): 304-308.
- [12] RUAN S Q H, LIU Y Z. Effects of Weiyanyihao-Recip on SOD, MDA in rats with chronic atrophic gastritis [J]. Global Tradit Chin Med(环球中医药), 2009, 2(3): 185-187.
- [13] LIU S S, WANG P C, XU Y S, et al. Study on the effect of the treatment of *Periplaneta americana* extract Ento-B by 2,4-dinitrochlorobenzene combined with acetic acid induced ulcerative colitis in rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2018, 29(10): 2313-2316.
- [14] SU F Z, YU W T, YANG M Y, et al. Influence of Weiyanyin formula on the expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 in gastric ulcer rats [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2015, 56(5): 418-422

收稿日期: 2019-05-22

(本文责编: 沈倩)