

美洲大蠊提取物对乙醇致小鼠急性胃溃疡的预防作用

邹俊波, 桑文涛, 王芳, 杨胜群, 张彤, 曾南*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 考察美洲大蠊提取物及其分段分子量(M)部分对乙醇致小鼠急性胃溃疡的预防作用, 并探讨其作用机制。

方法 将80只SPF级ICR雄性小鼠随机分为空白组, 模型组, 康复新液组, 美洲大蠊提取物组以及M < 1 000 Da、1 000 Da < M < 5 000 Da、5 000 Da < M < 10 000 Da、M > 10 000 Da部分组, 每组灌胃给予相应药物, 连续给药7 d。除空白组外, 其余组无水乙醇造模, 处死动物后测定溃疡抑制率, 进行胃黏膜病理学观察, 测定相应指标含有量或活性。**结果** 与空白组相比, 模型组小鼠胃黏膜溃疡病变明显, 炎性细胞浸润明显增多, 脂质过氧化物丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)含有量明显升高, 而组成型一氧化氮合酶(cNOS)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性明显下降。与模型组相比, 美洲大蠊提取物及其1 000 Da < M < 5 000 Da部分溃疡抑制作用明显, 改善了小鼠胃组织的病理学状态, 还可显著降低胃黏膜损伤组织内MDA、NO和iNOS水平, 提高cNOS、SOD、CAT和GSH-Px活性。**结论** 美洲大蠊提取物可通过降低氧自由基及NO自由基的含有量而预防急性胃溃疡, 其中1 000 Da < M < 5 000 Da部分作用最为明显。

关键词: 美洲大蠊; 急性胃溃疡; 氧化应激; 预防作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)11-2325-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.11.003

Protective effect of *Periplaneta americana* extract on mice with ethanol-induced acute gastric ulcer

ZOU Jun-bo, SANG Wen-tao, WANG Fang, YANG Sheng-qun, ZHANG Tong, ZENG Nan*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—State Key Laboratory Breeding Base Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the protective effects of *Periplaneta americana* L. extract and its segment molecular weight (M) parts on mice with ethanol-induced acute gastric ulcer and its mechanism of action. **METHODS** Eighty SPF ICR male mice were randomly divided into control, model, Kangfuxin Oral Liquid, *P. americana* extract, M < 1 000 Da, 1 000 Da < M < 5 000 Da, 5 000 Da < M < 10 000 Da and M > 10 000 Da parts groups. Intragastric administration of corresponding drugs were given to each group for successive seven days. Except for the control group, the models in another groups were established by anhydrous ethanol. Then all the animals were sacrificed, ulcer inhibition rate was detected, pathology observation of gastric mucosa was carried out, and contents or activities of relevant indices were determined. **RESULTS** Compared with the control group, the gastric mucosa of mice in model group showed obvious ulcer lesions, and infiltration of inflammatory cells was increased obviously, contents of lipid peroxides including malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were increased significantly, while activities of constitutive nitric oxide synthase (cNOS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were decreased

收稿日期: 2016-01-25

基金项目: 四川省科技厅中药药理四川省青年科技创新研究团队(2014TD0007)

作者简介: 邹俊波(1986—), 男, 博士生, 从事中药药效与毒理研究。E-mail: 470900966@qq.com

* 通信作者: 曾南(1969—), 女, 教授, 从事中药药效与毒理研究。Tel: 13668261810, E-mail: zengnan966@126.com

significantly. Compared with the model group, the inhibitory effects of *P. americana* extract and its 1 000 Da < M < 5 000 Da part on ulcer were obvious, the pathological state of mice's stomach tissue was improved, the levels of MDA, NO and iNOS were obviously decreased, and the activities of cNOS, SOD, CAT and GSH-Px were significantly increased. **CONCLUSION** *P. americana* extract can prevent acute gastric ulcer by decreasing the contents of oxygen free radicals and NO free radical oxidations, especially 1 000 Da < M < 5 000 Da part.

KEY WORDS: *Periplaneta americana* L.; acute gastric ulcer; oxidative stress; protective effect

美洲大蠊 *Periplaneta americana* L. 属于昆虫纲蜚蠊目蜚蠊科, 在地球上有一亿多年的历史, 有“活化石”之称, 是至今繁衍最成功的昆虫类群之一^[1]。美洲大蠊作为药用, 最早见于《神农本草经》, 目前以其为原料开发的中成药康复新液药理作用显著, 对胃溃疡, 尤其是酒精性胃溃疡有明显的预防及治疗作用, 但因其物质基础及作用机理尚不明确, 对其进一步的临床推广应用有较大的限制。

胃溃疡的形成过程与自由基密切相关, 酒精性胃溃疡的发生就是乙醇可影响到多种脱氢酶的表达, 如乙醇脱氢酶, 可使乙醛产量增多, 乙醛不仅在黄嘌呤氧化酶 (XOD) 作用下生成氧自由基, 如羟自由基 (OH⁺)、超氧阴离子 (O²⁻)、过氧化氢 (H₂O₂)、羟乙基自由基等活性氧 (ROS), 其自身也能产生氧自由基导致胃黏膜损伤^[2]。

本实验通过制备美洲大蠊提取物, 并利用分子滤膜依据分子量将其制备成不同部分, 对其抗乙醇致小鼠胃溃疡的药理作用进行考察, 并首次从抗氧化应激损伤角度对其作用机理进行初步探讨。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF级 ICR 雄性小鼠, 体质量 25~27 g, 购自四川省中医药科学院, 动物合格证号 SCXK (川) 2013-24, 饲养于国家中医药管理局成都中医药大学中药药理科研三级实验室 (编号 TCM-2009-315)。每笼 10 只。

1.2 试药和试剂 美洲大蠊饮片购于成都荷花池中药材市场, 经成都中医药大学马逾英教授鉴定为蜚蠊科大蠊属昆虫美洲大蠊 *Periplaneta americana* L.。拣选、粉碎美洲大蠊饮片, 加 12 倍量 70% 乙醇连续回流提取 2 次, 每次 2 h, 减压回收乙醇, 浓缩收膏, 再加入 20 倍量纯化水, 混合、搅拌充分, 静置待药液分层, 过滤, 收集滤液, 减压浓缩, 量取浓缩液适量, 转移至分液漏斗, 加入 3 倍体积量石油醚充分振摇提取 2 次, 收集水层提取液, 加入 3 倍体积量正丁醇振摇提取 2 次, 收集水层提取液, 再加入 3 倍体积量乙酸乙酯振摇提取 2

次, 收集水层溶液, 减压浓缩, 即得美洲大蠊提取物 (出膏率 10.95%), 根据分子量 (M) 大小通过超滤膜, 对该提取物进行砍段分离, 分别制备 M < 1 000 Da、1 000 Da < M < 5 000 Da、5 000 Da < M < 10 000 Da、M > 10 000 Da 部分, 作为受试药物, 备用。

美洲大蠊提取物 (批号 20131012), 由成都百草和济科技有限公司提供; 美洲大蠊提取物 M < 1 000 Da、1 000 Da < M < 5 000 Da、5 000 Da < M < 10 000 Da、M > 10 000 Da 部分 (批号 20131206-1、20131206-2、20131206-3、20131206-4, 出膏率分别为 4.64%、1.82%、2.69%、1.16%), 均由江西中医药大学国家制剂工程中心重点实验室提供; 康复新液 (批号 M140937, 湖南中南科伦药业有限公司, 口服剂量 30 mL); PBS、多聚甲醛、NaOH、无水乙醇等均为分析纯。

考马斯亮蓝蛋白质定量试剂盒 (批号 A045-2)、NO 试剂盒 (批号 A013-2)、iNOS 三型同测试剂盒 (批号 A014-1)、CAT 试剂盒 (批号 A007-1)、SOD 试剂盒 (批号 A001-3)、MDA 试剂盒 (批号 A003-1)、GSH 试剂盒 (批号 A005), 均购自南京建成生物工程研究所。

4% 多聚甲醛溶液的配制: 精密称取多聚甲醛 40 g, 置于 1 000 mL PBS 缓冲液中, 加适量 1 mol/L NaOH 溶液 (pH 7.4), 60 ℃ 水浴磁力搅拌使其溶解, 即得。

1.3 仪器 相关手术器械; BS323S 电子天平 (精度 0.001 g, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); R680 酶标仪 (上海精科仪器厂); 冷冻离心机 (赛默飞世尔科技 [中国] 有限公司)。

2 方法^[3-6]

2.1 动物分组及给药 所有动物适应性喂养 3 d, 按体质量随机分为 8 组, 空白组、模型组、康复新液组 (3.90 mL/kg)、美洲大蠊提取物组 (141.77 mg/kg)、提取物 M < 1 000 Da 组 (60.09 mg/kg)、提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 组 (23.51 mg/kg)、提取物 5 000 Da < M < 10 000 Da

组(34.79 mg/kg)和提取物 M > 10 000 Da 组(14.98 mg/kg), 每组10只, 各组给药剂量均按照药材日服剂量10 g, 结合各部位的出膏率进行换算, 相当于临床剂量的8倍。各组自实验当天开始, 按0.2 mL/10 g 给药量灌胃给予相应药物, 空白组和模型组给予等量生理盐水。

2.2 模型复制及取材 所有动物连续给药7 d, 第6天开始禁食不禁水24 h, 第7天分批给药2 h后, 除空白组外, 其余各组小鼠按0.15 mL/10 g 剂量灌胃无水乙醇, 空白组小鼠灌胃等量生理盐水。乙醇造模1 h后, 立即脱颈处死动物, 剖腹取胃, 沿胃大弯剪开, 用生理盐水洗净, 滤纸吸干, 剪取胃黏膜病变明显部位(5 mm × 5 mm), 置于4%多聚甲醛溶液中固化, 剩余部分在冰浴上迅速剔下黏膜层, 称定质量后用冰生理盐水制成10%匀浆, 冷冻离心机于4 ℃、3 500 r/min 下离心10 min, 取上清液, -20 ℃保存备用。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 溃疡抑制率 游标卡尺测量出胃充血或弥漫性出血条带的长、宽度并记分, 病灶宽度 < 1 mm按1 mm计, 分别计算各溃疡条带面积, 面积 < 1 mm²计1分, 1~2 mm²计2分, 2~3 mm²计3分, 3~4 mm²计4分, 超过4 mm²分段计。以全胃病灶分数总和为该动物溃疡指数, 并计算溃疡抑制率, 公式为溃疡抑制率 = [(模型组溃疡指数平均值 - 给药组溃疡指数平均值) / 模型组溃疡指数平均值] × 100%。

2.3.2 组织学损伤观察 取固化好的胃黏膜病变组织, 送至四川省第二中医医院病理室进行石蜡包埋切片, 常规HE染色, 显微镜观察胃组织病理变化等组织学损伤观察。

2.3.3 WST法测定SOD活性 选取2例空白组样本, 将1%组织匀浆分别稀释2、5、10倍进行预实验, 选取抑制率在40%~60%的对应剂量, 进行正式批量实验, 最终确定组织稀释5倍, 即0.2%为最佳剂量, 按照SOD试剂盒说明书测定组织SOD活性。其中, 胃黏膜组织蛋白含有量通过考马斯亮蓝法测定, 具体方法为精密称取各组胃黏膜组织, 按照质量(g): 体积(mL) 1:9比例加入生理盐水, 冰浴匀浆, 制备成10%组织匀浆, 冷冻离心机于4 ℃、3 500 r/min 下离心10 min, 取上清液, 生理盐水按1:9比例稀释成1%组织匀浆, 按照考马斯亮蓝试剂盒说明书测定组织蛋白含有量。后续相关指标均同法测定。

2.3.4 TBA法测定MDA含有量 取10%生理盐水组织匀浆适量, 3 500 r/min 离心10 min 取上清, 按照MDA试剂盒说明书测定组织MDA含有量。

2.3.5 CAT活性测定 取10%生理盐水组织匀浆适量, 稀释至1%, 3 500 r/min 离心10 min 取上清, 按照CAT试剂盒说明书测定组织CAT活性。实验具体测定过程中使用酶标仪微孔法进行活性测定, 与说明书中紫外分光光度法略有不同, 所得实验数据进行换算予以校准。

2.3.6 GSH-PX活性测定 分别取10%、5%、1%组织匀浆进行预实验, 选取抑制率15%~55%的对应剂量, 再选取抑制率在45%或50%左右作为最佳取样剂量, 进行正式批量实验, 最终确定1%为最佳剂量, 按照GSH-Px试剂盒说明书测定组织GSH-Px活性。实验具体测定过程中使用酶标仪微孔法进行活性测定, 与说明书中紫外分光光度法略有不同, 所得实验数据进行换算予以校准。

2.3.7 NO含有量测定 10%生理盐水组织匀浆, 于3 500 r/min 下离心10 min 取上清, 按照NO试剂盒说明书测定组织和血清中的NO含有量。

2.3.8 iNOS和cNOS活性测定 根据试剂盒说明书进行相关预试验, 选取最佳测定浓度, 测定组织iNOS和cNOS活性。

2.4 统计方法 用SPSS 19.0软件进行统计分析。数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 符合正态分布者组间采用ANOVA分析, 方差齐者组间进行LSD检验, 方差不齐者进行Tamhane's T2检验, 不符合正态分布者组间采用非参数检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 各药物组对乙醇致小鼠胃溃疡模型溃疡抑制率的影响 胃溃疡指数及抑制率测定结果表明, 与空白组相比, 模型组有极显著性差异($P < 0.01$), 提示乙醇致小鼠胃溃疡模型复制成功; 与模型组相比, 美洲大蠊提取物组、提取物1 000 Da < M < 5 000 Da组和阳性药组动物溃疡指数明显降低, 溃疡抑制率明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 其余各组均具有降低实验动物溃疡指数的趋势($P > 0.05$)。结果见图1和表1。

3.2 各药物组对乙醇致小鼠胃溃疡模型溃疡组织病理形态的影响 正常实验小鼠胃组织层次整齐, 如图2A所示, 黏膜、黏膜下层、肌层及浆膜层层次分明, 显微镜下无损伤或炎症。模型组实验动物病变集中于胃黏膜及其下层, 表现为溃疡性糜烂、

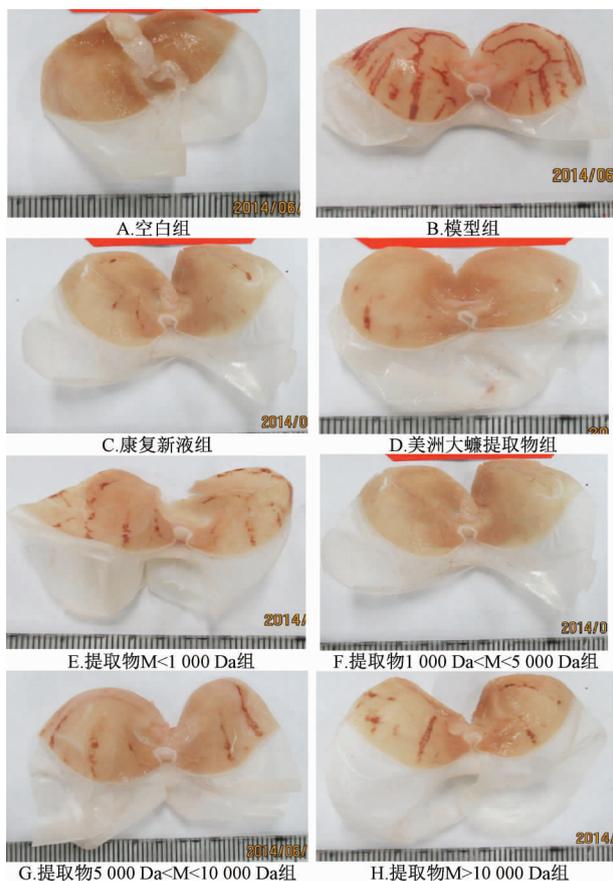


图1 美洲大蠊各提取物小鼠胃部剖面图

Fig. 1 Cutaway views of various extracts from *P. americana* on stomach of mice

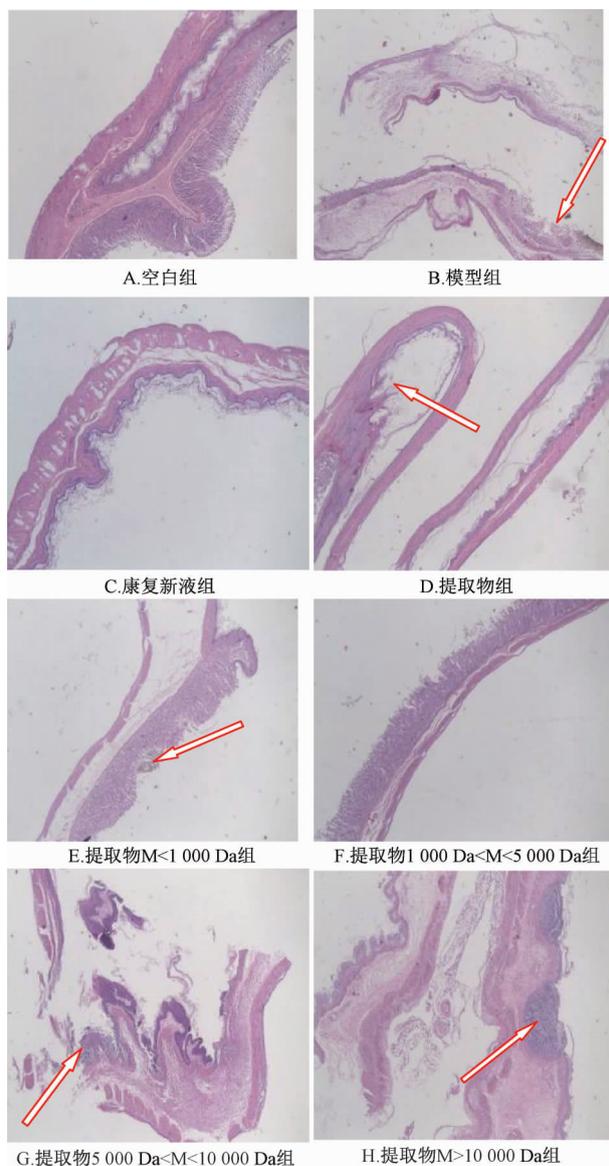
纤维化病变，黏膜水肿、充血及隐窝炎，黏膜下层可见大量炎性细胞浸润，以淋巴滤泡增生和炎细胞浸润为主，见图2B。阳性药（康复新液）组和美洲大蠊提取物1 000 Da < M < 5 000 Da组实验动物胃溃疡少见，黏膜水肿和充血现象明显减轻，几乎看不到炎细胞浸润，见图2C和2F。其余各组胃黏膜层可见明显溃疡，组织水肿和炎细胞浸润现象突出，如图2D、2E、2G和2H所示。

表1 美洲大蠊各提取物对小鼠胃溃疡抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Effects of various extracts from *P. americana* on the inhibition rate of gastric ulcer of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	溃疡指数/分	胃溃疡抑制率/%
空白组	-	0.00 ± 0.00 **	100.00 ± 0.00 **
模型组	-	152.89 ± 17.11	-
美洲大蠊提取物组	141.77	18.27 ± 4.46 *	88.05 ± 22.54 *
提取物 M < 1 000 Da 组	60.09	69.99 ± 21.29	54.22 ± 27
提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 组	23.51	8.52 ± 1.94 **	94.43 ± 33.32 **
提取物 5 000 Da < M < 10 000 Da 组	34.79	91.70 ± 44.35	40.02 ± 24.77
提取物 M > 10 000 Da 组	14.98	64.31 ± 15.27	57.94 ± 34.84
康复新液组	3.90 mL	15.21 ± 6.59 *	90.05 ± 17.39 *

注：与模型组比较，* P < 0.05，** P < 0.01



注：箭头处为溃疡部分

图2 美洲大蠊各提取物对小鼠胃组织病理形态的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effects of various extracts from *P. americana* on gastric tissue histopathology of mice (HE, ×100)

3.3 受试药物对乙醇致胃溃疡模型小鼠胃黏膜组织 SOD 和 MDA 活性的影响 与空白组相比,模型组小鼠胃黏膜组织 SOD 含有量显著下降($P < 0.05$),MDA 含有量显著上升($P < 0.05$);与模型组相比,美洲大蠊提取物、提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 部

分及阳性药康复新液组小鼠胃黏膜组织 SOD 活性显著升高($P < 0.05$),同时 MDA 含有量显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其他各组仅表现出升高 SOD 活性,降低 MDA 含有量的趋势,与模型组相比无统计学差异($P > 0.05$)。结果见表 2。

表 2 受试药物对小鼠胃黏膜组织 SOD 和 MDA 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 2 Effects of tested drugs on the contents of SOD and MDA of gastric mucosal tissue in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	SOD/(U·g prot ⁻¹)	SOD 提高率/%	MDA/(nmol·mg prot ⁻¹)	MDA 减少率/%
模型组	0.23 ± 0.05	-	4.52 ± 1.33	-
空白组	0.55 ± 0.07 *	139.13 ± 27.83 *	2.22 ± 1.23 *	50.88 ± 10.18 *
美洲大蠊提取物组	0.59 ± 0.17 *	156.52 ± 31.30 *	2.03 ± 0.52 **	55.09 ± 11.02 **
提取物 M < 1 000 Da 组	0.24 ± 0.14	4.35 ± 0.87	4.30 ± 1.19	4.87 ± 0.97
提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 组	0.68 ± 0.15 **	195.65 ± 39.13 **	1.81 ± 0.86 **	59.96 ± 11.99 **
提取物 5 000 Da < M < 10 000 Da 组	0.27 ± 0.02	17.39 ± 3.48	4.51 ± 1.1	0.22 ± 0.04
提取物 M > 10 000 Da 组	0.31 ± 0.13	34.78 ± 6.96	4.17 ± 1.01	7.74 ± 1.55
康复新液组	0.62 ± 0.19 *	169.57 ± 33.91 *	2.63 ± 1.16 *	41.81 ± 8.36 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.4 受试药物对小鼠胃黏膜组织 CAT 和 GSH-Px 活性的影响 与空白组相比,模型组胃黏膜组织 CAT 活性和 GSH-Px 活性均显著下降($P < 0.01$);与模型组相比,美洲大蠊提取物组、提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 组和阳性药康复新液组小鼠 CAT 活性均显著升高($P < 0.05$),前两者还可显著提

高 GSH-Px 活性($P < 0.05$);提取物 M < 1 000 Da 部分有升高 CAT、降低 GSH-Px 活性的趋势,提取物 5 000 Da < M < 10 000 Da 部分表现出升高 GSH-Px、降低 CAT 活性的趋势,提取物 M > 10 000 Da 组实验动物 CAT 及 GSH-Px 活性均呈下降趋势,但均无显著性差异($P > 0.05$)。结果见表 3。

表 3 受试药物对小鼠胃黏膜组织 CAT 及 GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 3 Effects of tested drugs on the activities of CAT and GSH-Px of gastric mucosal tissue in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	CAT 活性/(U·mg prot ⁻¹)	CAT 提高率/%	GSH-Px 活性/(U·mg prot ⁻¹)	GSH-Px 提高率/%
模型组	121.42 ± 70.23	-	154.44 ± 21.36	-
空白组	339.33 ± 72.41 **	179.47 ± 35.89 **	193.95 ± 27.04 **	25.58 ± 5.11 **
美洲大蠊提取物组	207.89 ± 168.13 *	71.22 ± 14.24 *	214.45 ± 16.09 *	38.86 ± 7.77 *
提取物 M < 1 000 Da 组	158.24 ± 62.55	30.32 ± 6.06	139.98 ± 59.89	-9.36 ± 1.87
提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 组	265.17 ± 96.57 *	118.39 ± 23.68 *	228.66 ± 94.10 *	48.06 ± 9.61 *
提取物 5 000 Da < M < 10 000 Da 组	115.60 ± 22.82	-4.79 ± 0.95	156.24 ± 13.82	1.17 ± 0.23
提取物 M > 10 000 Da 组	113.20 ± 49.63	-6.77 ± 1.35	108.69 ± 33.76	-29.62 ± 5.92
康复新液组	232.93 ± 70.16 *	91.84 ± 18.36 *	195.15 ± 52.26	26.36 ± 5.27

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.5 受试药物对小鼠胃黏膜组织 NO 含有量及 iNOS、cNOS 活性的影响 与空白组相比,模型组小鼠 NO 含有量及 iNOS 含有量显著升高,cNOS 活性则显著下降($P < 0.05$);与模型组相比,美洲大蠊提取物组、提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 组和阳性药康复新液组小鼠胃黏膜组织 NO 含有量及 iNOS 含有量显著下降,cNOS 活性则显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),其他各组仅表现出降低 NO 及 iNOS 含有量,升高 cNOS 含有量的趋势,提取物 5 000 Da < M < 10 000 Da 组表现出降低 cNOS 活性的趋势,但均无显著性差异($P > 0.05$)。结果

见表 4。

4 讨论

现已证实,胃肠黏膜在化学物质、缺血或细胞能量不足等情况下会产生大量的氧自由基。胃肠道中黄嘌呤脱氢酶含有量远高于其它组织,故胃肠道被喻为产生氧自由基的“定时炸弹”^[7]。氧自由基在整体水平和细胞水平都可以引起胃黏膜或黏膜细胞的脂质过氧化,导致胃黏膜血流障碍,引发胃黏膜损伤^[8]。MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸形成的脂质过氧化物,可引起蛋白质变性和交联,使 DNA 损伤,酶及激素失活,损害细

表4 受试药物对小鼠胃黏膜组织 NO、iNOS 和 cNOS 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Effects of tested drugs on the contents of NO, iNOS and cNOS of gastric mucosal tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{g prot}^{-1}$)	iNOS/($\mu\text{mol} \cdot \text{g prot}^{-1}$)	cNOS/($\mu\text{mol} \cdot \text{g prot}^{-1}$)
模型组	10.23 ± 0.55	21.06 ± 1.37	73.59 ± 42.61
空白组	4.57 ± 0.53 *	3.67 ± 0.56 **	118.91 ± 55.74 *
美洲大蠊提取物组	6.12 ± 0.56 *	4.79 ± 0.58 **	121.76 ± 30.13 *
提取物 M < 1 000 Da 组	9.11 ± 1.01	17.58 ± 1.08	83.44 ± 34.52
提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 组	4.87 ± 0.67 *	5.09 ± 0.49 **	113.45 ± 41.95 *
提取物 5 000 Da < M < 10 000 Da 组	8.61 ± 1.02	19.07 ± 1.53	40.04 ± 9.18
提取物 M > 10 000 Da 组	6.78 ± 0.75	15.69 ± 4.68	80.13 ± 23.98
康复新液组	5.45 ± 1.84 *	7.07 ± 0.83 **	112.14 ± 51.53 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

胞及细胞膜,反映了体内脂质过氧化程度,并间接反映机体细胞受自由基攻击的严重性,进而反映细胞损伤的程度^[9-10]。SOD、CAT、GSH-Px 是生物体内氧自由基清除系统的重要防线,并具有修复细胞功能^[11],SOD 是存在于生物体内的一种抗氧化酶,能特异性清除超氧阴离子,催化超氧化自由基分解成 H₂O₂,进而在过氧化酶(CAT)作用下分解成 H₂O 和氧分子;CAT 是生物体内一种酶类清除剂,可促使 H₂O₂ 分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受 H₂O₂ 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,其主要作用是清除脂类过氧化物,可催化脂质过氧化物(LPO)分解生成相应的醇,防止其均裂和引发脂质过氧化作用的链式支链反应,减少其生成以保护机体免受损害^[12];SOD、CAT 及 GSH-Px 含有量水平的高低反映了机体清除自由基能力的大小,酶活性越低,说明局部耗竭越多,机体清除自由基能力越弱,炎症则趋于严重;提高局部自由基清除剂 SOD 及 CAT 等的活性,则可以有效预防炎症的发生和发展。

本实验发现,模型组小鼠胃黏膜组织中 MDA 含有量明显升高,而 SOD、CAT 及 GSH-Px 活性显著下降,表明脂质过氧化反应参与了乙醇致小鼠胃溃疡的病理生理过程。预先给予美洲大蠊提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 部分后,能显著提高 SOD 活性,降低胃黏膜 MDA 含有量,对 CAT 活性有一定提高趋势,表明该部分具有抗脂质过氧化、阻遏自由基产生和清除自由基的作用,与其抗乙醇性胃损伤作用相关。刘光明等^[13]报道,美洲大蠊中分子量小于 5 000 Da 的抗癌活性成分具有一定抗氧化活性,其活性弱于维生素 C 且与浓度呈正相关性,其组成成分中多肽成分占有 62.7% 比例,本

实验提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 部分与其报道成分的相似度有待进一步探究。

NO 是一种免疫分子和炎症介质,也是一种自由基。胃溃疡病变黏膜中,NO 由 NOS 催化 L-精氨酸产生,NOS 活性增高及 NO 浓度的增加与炎症程度呈平行关系。体内 NOS 有结构型 NOS(cNOS)和诱导型 NOS(iNOS)2 种,前者先天性存在,生成 NO 数量较少,产生迅速;后者在生理情况下基本不表达,当受到某些细胞因子、病原微生物或肿瘤细胞刺激后,即被激活,大量产生 iNOS,而且持续时间长。其中,cNOS 催化的 NO 对黏膜起保护作用,而 iNOS 催化的 NO 对黏膜有杀伤毒性及促炎作用^[14-15]。本实验显示,乙醇损伤的小鼠胃溃疡模型中,胃黏膜 NO 含有量较空白组明显升高,提示其可能参与了小鼠乙醇损伤性胃溃疡的病理过程;预先给予美洲大蠊提取物及 1 000 Da < M < 5 000 Da 部分时,能明显降低 NO 的含有量,表明其抗溃疡作用与其抑制胃黏膜 NO 含有量升高有关。但乙醇损伤后胃黏膜 NO 含有量升高以及美洲大蠊提取物使 NO 含有量降低的机制目前还不清楚,有待进一步研究。

乙醇致小鼠胃溃疡模型胃黏膜组织内脂质过氧化物 MDA 及 NO 含有量明显升高,而 SOD、CAT 活性及 GSH-Px 活性明显下降,表明乙醇引起的急性胃溃疡与氧自由基及 NO 自由基含有量的升高直接相关。预先给予美洲大蠊提取物和其 1 000 Da < M < 5 000 Da 部分时,能显著对抗无水乙醇所致胃黏膜损伤组织内 NO 水平升高,抑制 MDA 生成,提高 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性。结果提示,美洲大蠊提取物有明显抗氧自由基及降低 NO 含有量的作用,是其对抗乙醇诱导的急性胃黏膜损伤的作用机制之一,而且其中的 1 000 Da < M < 5 000 Da 部分是美洲大蠊发挥抗溃疡作用的重要物质基础。综

上所述,美洲大蠊提取物 1 000 Da < M < 5 000 Da 部分可通过提高胃黏膜局部的抗氧化应激作用来有效预防胃溃疡炎症的发生和发展,是其成方制剂康复新液抗胃溃疡的重要物质基础之一,也是有效成分发现应重点关注的有效部位。

参考文献:

[1] 何正春,彭芳,宋丽艳,等. 美洲大蠊化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21): 2326-2331.

[2] Siegmund S V, Singer M V. Effects of alcohol on the upper gastrointestinal tract and the pancreas—an up-to-date overview [J]. *Z Gastroenterol*, 2005, 43(8): 723-736.

[3] 李佃贵,李瑞东,王静,等. 胃痛宁胶囊对胃溃疡大鼠胃组织形态及血清 NO、血浆 ET、PAF 含量的影响[J]. 中成药, 2006, 28(2): 270-272.

[4] 杨苹,马世平. 复方丹蒲汤抗实验性胃溃疡的作用[J]. 中成药, 2006, 28(3): 391-394.

[5] 柳丽,张洪泉. 丹参饮对大鼠胃溃疡边缘黏膜细胞凋亡和部分生长因子表达的影响[J]. 中成药, 2006, 28(3): 394-397.

[6] 林青,曹东,杨玉琪,等. 康复新液抗实验性胃溃疡作用的研究[J]. 中成药, 2001, 23(2): 46-48.

[7] Mocord J M. Radical explanations for old observations[J]. *Gastroenterology*, 1987, 92(6): 2026-2028.

[8] Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, et al. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats[J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(9): 656-662.

[9] Yoshimura T, Sugata H. Alcohol scavenges nitric oxide in gastric lumen[J]. *Nitric Oxide*, 2002, 6(3): 347-352.

[10] Sakai H, Ohira Y, Tanaka A, et al. Inhibition of small-conductance Cl⁻ channels by the interleukin-1beta-stimulated production of superoxide in rabbit gastric parietal cells[J]. *J Physiol*, 2003, 551(Pt1): 207-217.

[11] Konturek P C, Kania J, Hahn E G, et al. Ascorbic acid attenuates aspirin-induced gastric damage: role of inducible nitric oxide synthase [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57 (Suppl 5): 125-136.

[12] Parlesak A, Billinger M H, Bode C, et al. Gastric alcohol dehydrogenase activity in man: influence of gender age alcohol consumption and smoking in a Caucasian population[J]. *Alcohol Alcohol*, 2002, 37(4): 388-393.

[13] 张成桂,何正春,焦春香,等. 美洲大蠊抗癌活性成分体外抗氧化活性分析[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2249-2251.

[14] 李兆基,湛先保. 胃粘膜损伤与保护[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.

[15] Lenz H J, Ferrari-Taylor J, Isenberg J I. Wine and five percent ethanol are potent stimulants of gastric acid secretion in humans[J]. *Gastroenterology*, 1983, 85(5): 1082-1087.