

# 基于 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路探讨半夏泻心汤对慢性萎缩性胃炎大鼠的影响及作用机制

石铖<sup>1</sup>, 王茜<sup>1</sup>, 刘宇<sup>1</sup>, 郝蕾<sup>1</sup>, 韩雪<sup>1</sup>, 王彦刚<sup>2\*</sup>

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100018)

**[摘要]** **目的:**探讨半夏泻心汤通过调控 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1(Keap1)-核因子 E<sub>2</sub> 相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路防治慢性萎缩性胃炎的作用机制。**方法:**取 SD 大鼠,除 12 只正常组大鼠外,其余大鼠联合造模法复制大鼠慢性萎缩性胃炎(CAG)模型,造模成功后随即分为模型组,维酶素组(VG, 60 mg·kg<sup>-1</sup>)及半夏泻心汤高、中、低剂量组(280, 140, 70 mg·kg<sup>-1</sup>),分别相当于半夏泻心汤生药量 28, 14, 7 g·kg<sup>-1</sup>。正常组及模型组大鼠给予等体积的蒸馏水,各治疗组给予相应容积的药物灌胃。治疗 12 周后采用苏木素-伊红(HE)染色法观察 CAG 大鼠胃黏膜病理变化情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 CAG 大鼠胃黏膜中 Nrf2, 醌氧化还原酶-1(NQO1), 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)蛋白及 mRNA 的表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜组织 Nrf2, NQO1, GST 蛋白及 mRNA 表达水平升高( $P < 0.05$ ),胃黏膜萎缩,甚至肠化。与模型组比较,维酶素组及半夏泻心汤高、中剂量组 Nrf2, NQO1, GST 蛋白及 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ ),胃黏膜萎缩、肠化情况明显改善,且以高剂量组改善最为明显,但半夏泻心汤低剂量组作用不明显。**结论:**半夏泻心汤降低 Nrf2 的转录活性,关闭 Nrf2 信号通路,降低 NQO1, GST 的表达水平,实现正常的氧化-抗氧化平衡可能是其治疗 CAG 的作用机制之一。

**[关键词]** 半夏泻心汤; 慢性萎缩性胃炎(CAG); Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1(Keap1)-核因子 E<sub>2</sub> 相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路; Nrf2; 谷胱甘肽-S-转移酶(GST); 醌氧化还原酶-1(NQO1)

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0031-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211901

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210812.1352.005.html>

**[网络出版日期]** 2021-08-12 14:38

## Effect and Mechanism of Banxia Xiexintang on Rats with Chronic Atrophic Gastritis Based on Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway

SHI Cheng<sup>1</sup>, WANG Xi<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>, HAO Lei<sup>1</sup>, HAN Xue<sup>1</sup>, WANG Yan-gang<sup>2\*</sup>

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100018, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Banxia Xiexintang (BXXX) in preventing and treating chronic atrophic gastritis (CAG) through Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway. **Method:** SD rats were divided into a normal group ( $n=12$ ) and an experimental group for CAG model induction. The model rats were then randomly divided into a model group, a vatacoenayme (VG) group (60 mg·kg<sup>-1</sup>), and high- (280 mg·kg<sup>-1</sup>), medium- (140 mg·kg<sup>-1</sup>), and low-dose (70 mg·kg<sup>-1</sup>) BXXX groups. The doses in the BXXX groups were equivalent to 28, 14, and 7 g·kg<sup>-1</sup> crude drugs. The rats in the normal group and the model group received distilled water at an equal volume, and those in the VG group and the BXXX groups were treated

**[收稿日期]** 20210421(011)

**[基金项目]** 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2016070)

**[第一作者]** 石铖, 讲师, 在读博士, 从事中药学教学及研究工作, E-mail: 342949889@qq.com

**[通信作者]** \* 王彦刚, 博士, 教授, 从事中医临床及研究工作, E-mail: piwei001@163.com

correspondingly by gavage. After 12 weeks of treatment, hematoxylin-eosin (HE) staining was carried out to observe pathological changes in the gastric mucosa of CAG rats. Western blot and real-time fluorescence-based quantitative PCR was used to detect the protein and mRNA expression levels of Nrf2, glutathione S-transferase (GST), and NAD (P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the gastric mucosa of CAG rats. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased protein and mRNA expression levels of Nrf2, NQO1, and GST in the gastric mucosa of the rats ( $P<0.05$ ), atrophic gastric mucosa, and even intestinal metaplasia. The protein and mRNA expression levels of Nrf2, NQO1, and GST in the VG group and the high- and medium-dose BXXX groups were lower than those in the model group ( $P<0.05$ ), and gastric mucosa atrophy and intestinal metaplasia were significantly improved, especially in the high-dose BXXX group. However, the effect in the low-dose BXXX group was not significant. **Conclusion:** BXXX can blunt the transcriptional activity of Nrf2, shut down Nrf2 signaling pathway, and reduce the expression levels of NQO1 and GST to achieve normal oxidation-anti-oxidation balance, which may be one of its action mechanisms in the treatment of CAG.

**[Keywords]** Banxia Xiexintang; chronic atrophic gastritis (CAG); Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway; Nrf2; glutathione S-transferase (GST); NAD (P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)

慢性萎缩性胃炎(CAG)是以胃黏膜上皮和腺体萎缩、黏膜变薄、黏膜肌层增厚及伴有肠腺化生、不典型增生为特征的慢性疾病。该病易发生肠上皮化生(IM)和不典型增生(ATP),与胃癌的发生有密切关系,癌变率高达9%~10%。因此如何治疗CAG,逆转IM和ATP,防止癌症的发生是临床医家关注的重点。

氧化应激(OS)是现在的热门研究领域之一,是一种与炎症或环境应激有关的细胞应激。生理情况下,机体处于氧化-抗氧化的平衡状态,生命体得以正常生长。当这种平衡被打破,人体即会患病。氧化应激反应能够增强多种恶性肿瘤发生和发展的概率<sup>[1]</sup>。核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)可以调节细胞内大量具有抵抗自由基作用的物质的表达。Kelch样环氧丙烷相关蛋白-1(Keap1)-核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路是用于调节机体氧化炎症状态的重要通路之一,也是近几年研究的热门领域。当发生氧化应激时,Nrf2被激活,从而激活Keap1/Nrf2/ARE信号通路,调控下游靶基因醌氧化还原酶-1(NQO1),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等的转录和表达,保护细胞和组织免受氧化应激的损害<sup>[2]</sup>。且有研究发现CAG患者血清及胃黏膜氧自由基增多,抗氧化酶活性降低。说明CAG的发生与氧化应激相关,调节机体氧化应激可以达到治疗CAG的目的<sup>[3-6]</sup>。

中医无CAG病名,按其症状以“胃脘胀满不适”归属于“胃痞证”之范畴。半夏泻心汤出自《伤寒杂

病论》,是治疗心下痞满的经典方,具有和胃降逆,散结消痞之功效。长期以来,众多医家运用半夏泻心汤治疗CAG取得了满意疗效<sup>[7-9]</sup>。本人在跟随王彦刚教授出诊期间,发现其善用半夏泻心汤加减治疗CAG,效果显著,且前期研究发现CAG患者血清中GSH-Px,超氧化物歧化酶(SOD)减少<sup>[7]</sup>。但其是否通过影响Keap1/Nrf2/ARE信号通路,改善氧化应激而发挥治疗CAG的目的,目前尚不明确,且国内现在关于半夏泻心汤通过改善氧化应激而治疗CAG的研究尚不多见。

故实验以CAG大鼠模型为研究对象,对Keap1/Nrf2/ARE信号通路中的主控调节因子Nrf2及其调控的下游靶蛋白NQO1,谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的表达进行研究,旨在探讨CAG与Keap1/Nrf2/ARE信号通路的相关性及半夏泻心汤治疗CAG的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 70只体质量160~180g,月龄为6~8周的健康雄性清洁级SD大鼠,购自河北医科大学动物实验中心,合格证号SCXK(冀)2018-1-003。本研究经河北中医学院伦理委员会审批,审批号为DWLL2018048。

**1.2 药物** 半夏泻心汤组成:半夏12g,黄芩9g,干姜9g,黄连3g,人参9g,炙甘草9g,大枣12枚。以上药物均购自河北省中医院药房,并由药剂科主任关胜江教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》要求。后浓缩配成含生药2.8,1.4,0.7g·mL<sup>-1</sup>

的药液,于2~5℃冰箱储存备用。1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(MNNG,东京化成工业株式会社,批号NH8JH-LE);盐酸雷尼替丁胶囊(石家庄四药有限公司,批号LN16050402);维酶素胶囊(韦司太)(德州博成制药有限公司,批号W20151003);无水乙醇注射液[罗辅医药(上海)有限公司,规格500 mL]。

**1.3 试剂** TRIzol(美国Invitrogen公司,批号15596026);反转录试剂盒(美国Fementas,批号K1622);荧光定量试剂盒(北京华越洋生物科技有限公司,批号WD3122);Nrf2多克隆抗体(美国Abbkine公司,货号ABP0106);NQO1多克隆抗体(上海邦景实业有限公司,货号P114195);GST多克隆抗体(亚诺法生技股份有限公司,货号PAB13748);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,货号YT165);二抗(上海儒安生物科技有限公司,批号R210-100);内参抗体(武汉金开瑞生物工程有限公司,货号GC-MA000091M0m)。

**1.4 仪器** BHM36Humal型半自动生化分析仪(德国豪迈公司),8580090(10148)型高速冷冻离心机(美国Sigma公司),TDL-5-A型离心机(上海安亭科学仪器厂),LAUDA-C3型循环恒温水浴箱(天津泰克仪器有限公司),RM2125RT型石蜡切片机(徕卡上海分公司),756-PC型紫外-可见分光光度仪(上海谱振生物),DL-UV312型紫外透射仪(北京鼎盛生物技术有限公司),CKX41-A32PH型全能显微镜(日本Olympus公司),MDF-382E型超低温保存箱(日本Sanyo公司),PE9600型PCR扩增仪(美国PE公司),DYCZ-24DH型电泳仪及DYCP-31C型电泳槽(北京六一公司),INFINITY 3026型凝胶图像分析系统(法国VL公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 半夏泻心汤的制备:半夏泻心汤按照2.2项中的用量投料,置于蒸馏水中浸泡30 min(水面高出药物3 cm),武火煮沸后改文火,半夏先煎30~60 min至口尝无麻辣感,然后将其余药物放入煎锅中煎煮30 min,倒出药液。再加入适量蒸馏水(水面与药物持平),武火煮沸后文火慢煎30 min。将2次药液混合,用旋转蒸发器将水煎液减压浓缩至 $2.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 母液,使用200目尼龙网筛过滤,然后置于2~5℃冰箱储存备用,用时稀释。MNNG使用前加水制成质量浓度为 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。雷尼替丁胶囊用0.85%的氯化钠溶解。乙醇加蒸馏水制成体积分数为45%的乙醇溶液。

**2.2 动物模型制备** 将SD大鼠饲养于18~22℃明暗各12 h的清洁级动物实验室内,适应性喂养1周后随机抽取12只大鼠作为正常组,剩余58只大鼠作为模型组。采用联合造模法<sup>[10]</sup>即大鼠自由饮用MNNG的同时第1~8周,灌胃45%乙醇, $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 每周1次;第1~20周,用雷尼替丁 $0.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,建立CAG大鼠模型。造模过程中死亡6只,存活52只。造模20周后,随机抽取正常组和模型组大鼠各2只,处死后解剖取其胃组织做病理检查,直至大鼠胃黏膜层变薄,上皮细胞变性、坏死甚至脱落,固有腺体减少,排列紊乱提示造模成功。

**2.3 分组及给药方法** 确认造模成功后,将大鼠按随机数字表法分为6组,分别为正常组、模型组、维酶素组( $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及半夏泻心汤高、中、低剂量组( $280, 140, 70\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )剂量组,分别相当于半夏泻心汤生药量28, 14, 7  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,为成人临床剂量的20, 10, 5倍。正常组及模型组大鼠给予等体积的蒸馏水,各治疗组给予相应容积的药物灌胃。每天按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃1次,连续灌胃12周。12周后,各组大鼠禁食水48 h,10%水合氯醛 $3.5\text{ kg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 腹腔注射麻醉后取材。

**2.4 HE染色观察胃黏膜组织病理学变化** 取材后经甲醛固定,乙醇脱水,石蜡包埋,切片,二甲苯脱蜡,HE染色,中性树胶封片。在光学显微镜下(200×)观察胃黏膜组织病理学改变,参照慢性胃炎病理诊断标准和新悉尼系统的直观评分法<sup>[11]</sup>将炎症、萎缩和肠上皮化生等组织学变化分为无、轻、中、重度4个级别,分别计0, 1, 2, 3分。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达** 提取胃组织总蛋白,用考马斯亮蓝检测蛋白浓度,变性,BCA法进行蛋白定量,根据蛋白定量结果,上样至凝胶孔中,进行聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,分离蛋白,转膜,室温振荡封闭膜2 h,浸入一抗(1:1 000)工作液中,4℃反应过夜, TBST洗膜3次,每次10 min,然后加入羊抗兔二抗(1:5 000)工作液中室温孵育1 h, TBST洗膜3次,每次10 min。ECL试剂盒两种液体混合后均匀铺在PVDF膜表面,室温作用4 min,检测蛋白条带,曝光, DAB显色后,用Tanon Gis软件扫描各条带自动生成灰度值,目的蛋白表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

**2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测相关mRNA表达** 用TRIzol提取胃组织

总RNA。取RNA 5 μL用1%琼脂糖凝胶进行电泳,以检测RNA的完整性。用TIAN Script RT kit进行反转录,实验操作按产品说明书进行,取总RNA 1 μg,加入反应体系的第一部分[包括Oligo(dT) 50 μL, Super Pure dNTP, 无核酸酶双蒸水]管中,混匀,70 °C加热5 min,迅速在冰上冷却2 min,简短离心收集反应液后加入50 μL反应体系的第二部分(包括混合物, 5×First-Strand Buffer, RNasin, TIANscrip M-MLV),轻轻吸打混匀,25 °C温浴10 min,42 °C温浴50 min,95 °C加热5 min。用无核酸酶双蒸水将反应体系稀释到50 μL,-20 °C保存备用。PCR扩增条件为95 °C变性15 min,退火56 °C,95 °C延伸10 s,40个循环,58 °C,30 s 40个循环,72 °C,30 s 40个循环。根据Real-time PCR原始检测结果,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量计算公式,计算出各样品的目的基因相对定量结果,即其他各个样品相对于对照样品目的基因mRNA转录水平的差异。引物序列由Primer 3.0软件设计,各引物序列见表1。

**2.7 统计分析方法** 采用IBM SPSS 23.0分析软件对数据进行处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表达,方差齐选用最小显著性差异法(LSD),方差不齐选用非参数检验,计数资料采用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

| 引物      | 序列(5'-3')                | 长度/bp |
|---------|--------------------------|-------|
| Nrf2    | 上游 CCAGCACATCCAGACAGACA  | 158   |
|         | 下游 TGGGAATATCCAGGGCAAGC  |       |
| GST     | 上游 ATGGCCACATCTACGCAGTC  | 196   |
|         | 下游 GCCGAGTTAAGCCGGTTAGT  |       |
| NQO1    | 上游 AGCGCTTGACACTACGATCC  | 80    |
|         | 下游 TCTGCGTGGGCCAATAACAAT |       |
| β-actin | 上游 GTGGATCAGCAAGCAGGAGT  | 85    |
|         | 下游 CGCAGCTCAGTAACAGTCCG  |       |

统计学意义,病理学积分采用频率进行统计分析。

### 3 结果

**3.1 对CAG大鼠胃黏膜病理形态的影响** 正常组胃黏膜厚度正常,上皮细胞完整,腺体排列整齐且数量适中,无充血、水肿及炎性细胞浸润。模型组胃黏膜变薄,腺体减少且排列紊乱,多量腺体肠化,部分腺体增生性囊状扩张,黏膜及黏膜下层炎性细胞浸润;各给药组中维酶素、半夏泻心汤中、高剂量组黏膜增厚,腺体排列整齐,炎性细胞浸润数量减少,萎缩、肠化病理改变等减轻,且以半夏泻心汤高剂量组病理改善最明显,半夏泻心汤低剂量组胃黏膜未见明显改善。见表2,图1。

表2 半夏泻心汤对CAG大鼠胃黏膜组织病理积分的影响(M[Q1,Q3],n=10)

Table 2 Effect of Banxia Xiexintang on pathological score of gastric mucosa in CAG rats (M[Q1, Q3], n=10)

分

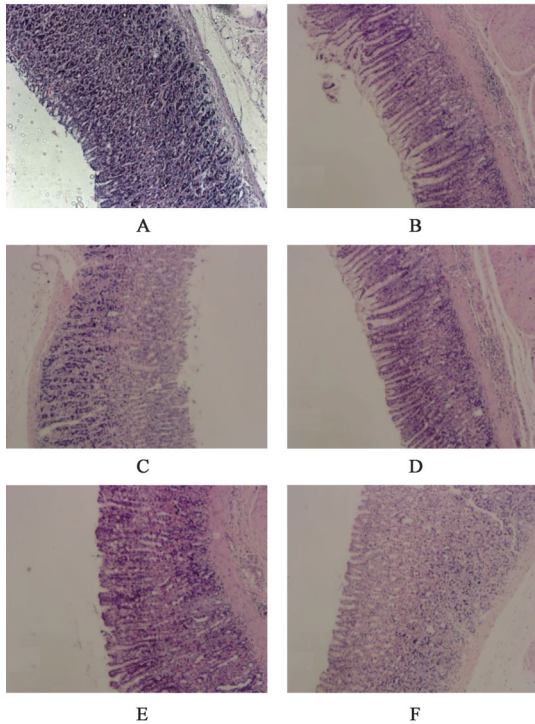
| 组别    | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | 炎症                           | 萎缩                           | 肠化生                          |
|-------|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常    |                        | 0.0(0.0,0.0)                 | 0.0(0.0,0.0)                 | 0.0(0.0,0.0)                 |
| 模型    |                        | 3.0(3.0,3.0) <sup>1)</sup>   | 3.0(3.0,3.0) <sup>1)</sup>   | 3.0(3.0,3.0) <sup>1)</sup>   |
| 维酶素   | 60                     | 1.0(0.0,1.0) <sup>2)</sup>   | 2.0(1.0,2.0) <sup>2)</sup>   | 2.0(1.0,2.0) <sup>2)</sup>   |
| 半夏泻心汤 | 70                     | 3.0(2.9,3.0)                 | 3.0(2.8,3.0)                 | 3.0(2.0,3.0)                 |
|       | 140                    | 1.0(0.0,1.0) <sup>2)</sup>   | 2.0(1.0,2.0) <sup>2)</sup>   | 2.0(1.0,2.0) <sup>2)</sup>   |
|       | 280                    | 0.0(0.0,0.4) <sup>2,3)</sup> | 1.0(0.0,1.0) <sup>2,3)</sup> | 0.0(0.0,0.2) <sup>2,3)</sup> |

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ;与维酶素组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ (表3,4同)。

**3.2 对CAG大鼠胃黏膜组织Nrf2, NQO1, GST蛋白表达水平的影响** 与正常组比较,模型组Nrf2, NQO1, GST蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,除半夏泻心汤低剂量组外,半夏泻心汤中、高剂量组及维酶素组均能明显降低CAG大鼠胃黏膜中Nrf2, NQO1, GST蛋白的表达水平( $P<0.05$ ),其中半夏泻心汤高、中剂量组在调节Nrf2, NQO1, GST蛋白表达水平方面差异无明显统计学意义,半夏泻心汤高、中剂量组在调节降低Nrf2, GST蛋白表达水平方面优于维酶素组,差异有统计

学意义( $P<0.05$ ),但在调节NQO1蛋白表达水平方面,半夏泻心汤高、中剂量组与维酶素组间差异无统计学意义。见图2,表3。

**3.3 对CAG大鼠胃黏膜组织Nrf2, NQO1, GST mRNA表达水平的影响** 与正常组比较,模型组Nrf2, NQO1, GST mRNA表达水平增高;与模型组相比,除半夏泻心汤低剂量组外,半夏泻心汤中、高剂量组及维酶素组均能显著降低CAG大鼠胃黏膜中Nrf2, NQO1, GST mRNA表达水平( $P<0.05$ ),其中半夏泻心汤高、中剂量组在调节Nrf2, NQO1,



A. 正常组; B. 模型组; C. 维酶素; D. 半夏泻心汤低剂量组; E. 半夏泻心汤中剂量组; F. 半夏泻心汤高剂量组

图1 半夏泻心汤对CAG大鼠胃黏膜组织病理的影响(HE, ×200)  
Fig. 1 Effect of Banxia Xiexintang on gastric mucosa pathology of CAG rats(HE, ×200)

GST mRNA表达水平方面差异无统计学意义,半夏泻心汤高、中剂量组在调节降低Nrf2, GST mRNA表达水平方面优于维酶素组( $P < 0.05$ ),但在调节

表3 半夏泻心汤对CAG大鼠胃黏膜Nrf2, GST, NQO1蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Banxia Xiexintang on protein expression levels of Nrf2, GST and NQO1 in gastric mucosa of CAG rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别    | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | Nrf2/ $\beta$ -actin      | GST/ $\beta$ -actin       | NQO1/ $\beta$ -actin    |
|-------|------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 正常    |                        | 0.22±0.12                 | 0.46±0.14                 | 0.49±0.15               |
| 模型    |                        | 0.64±0.13 <sup>1)</sup>   | 0.83±0.16 <sup>1)</sup>   | 0.82±0.15 <sup>1)</sup> |
| 维酶素   | 60                     | 0.48±0.11 <sup>2)</sup>   | 0.61±0.19 <sup>2)</sup>   | 0.47±0.16 <sup>2)</sup> |
| 半夏泻心汤 | 70                     | 0.62±0.12 <sup>4)</sup>   | 0.73±0.16                 | 0.79±0.18               |
|       | 140                    | 0.28±0.11 <sup>2,3)</sup> | 0.49±0.15 <sup>2,3)</sup> | 0.51±0.17 <sup>2)</sup> |
|       | 280                    | 0.20±0.11 <sup>2,3)</sup> | 0.43±0.17 <sup>2,3)</sup> | 0.59±0.19 <sup>2)</sup> |

表4 半夏泻心汤对CAG大鼠胃黏膜Nrf2, GST, NQO1 mRNA表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Banxia Xiexintang on mRNA expression levels of Nrf2, GST and NQO1 in gastric mucosa of CAG rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别    | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | Nrf2                      | GST                       | NQO1                    |
|-------|------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 正常    |                        | 0.33±0.12                 | 0.27±0.13                 | 0.28±0.11               |
| 模型    |                        | 1.66±0.17 <sup>1)</sup>   | 2.66±0.36 <sup>1)</sup>   | 2.20±0.18 <sup>1)</sup> |
| 维酶素   | 60                     | 0.60±0.19 <sup>2)</sup>   | 0.72±0.13 <sup>2)</sup>   | 0.36±0.17 <sup>2)</sup> |
| 半夏泻心汤 | 70                     | 1.24±0.21                 | 2.20±0.36                 | 2.08±0.38               |
|       | 140                    | 0.37±0.13 <sup>2,3)</sup> | 0.36±0.12 <sup>2,3)</sup> | 0.34±0.12 <sup>2)</sup> |
|       | 280                    | 0.39±0.12 <sup>2,3)</sup> | 0.35±0.09 <sup>2,3)</sup> | 0.31±0.09 <sup>2)</sup> |

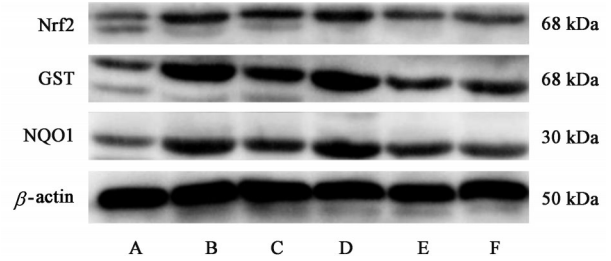


图2 各组大鼠胃黏膜Nrf2, GST, NQO1蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Nrf2, GST and NQO1 protein expression levels in gastric mucosa of each group rats

NQO1 mRNA表达水平方面,半夏泻心汤高、中剂量组与维酶素组间无显著差异。见表4。

#### 4 讨论

中医认为CAG发病多因饮食不节(洁)、情志不畅、外邪入侵、素体脾虚等,导致脾胃运化失司而湿邪内蕴,阻滞气血,久则耗气伤阴而发展为虚实寒热错杂之证,并按其症状以胃脘痞满、暖气频频归属于“胃痞证”“暖气”的范畴。故治疗时应健脾益气、和胃降逆,消痞散结,并依据患者病证寒热选择温中散寒或清热泻火之品。临床观察亦发现患者表现均有病情虚实夹杂、脾胃阴阳失调等特征,常见辨证分型为脾胃虚弱型,治疗多以调和脾胃阴阳为主<sup>[12]</sup>。

半夏泻心汤中半夏和胃降逆,消痞散结为君;干姜温中散寒,黄芩、黄连清泄里热为臣;人参、炙甘草、大枣益气健脾,和中补虚为佐。此方中药味

有辛有苦,药性有寒有温,辛主升主开,苦主降主泄,寒清热,温祛寒,是调和脾胃阴阳的代表方剂。现代药理研究发现半夏泻心汤具有保护胃黏膜、抗胃肠道肿瘤的作用<sup>[13]</sup>。

近年来的研究证实,半夏泻心汤可调节CAG大鼠炎症因子<sup>[14]</sup>、胃蛋白酶原及胃泌素含量<sup>[15-16]</sup>从而达到治疗CAG的目的,亦有学者通过网络药理学研究发现半夏泻心汤可能通过调节炎症反应、免疫功能、氧化应激和血管生成等对CAG发挥治疗作用<sup>[17]</sup>。

Keap1/Nrf2/ARE信号通路为机体内抗氧化应激的主要通路之一,可以抵抗内外界氧化和化学物质等刺激导致的氧化应激反应,提高细胞的抗氧化应激和修复功能,能防止正常细胞发生癌变<sup>[18]</sup>。在生理情况下,Nrf2与Keap1结合并以非活性状态存在于胞浆中,经泛素化后迅速降解,此时Nrf2保持低转录活性<sup>[19]</sup>。当细胞受到某些致癌物刺激后,Nrf2与Keap1解偶联活化并转运进入细胞核,之后与抗氧化反应原件(AREs)结合<sup>[20]</sup>,激活Keap1/Nrf2/ARE信号通路。该通路被激活后,可启动下游多种靶蛋白的表达<sup>[21-23]</sup>,诸如NQO1,GST,SOD,GSH-Px等,从而增强细胞及组织对氧化应激的抵抗力,恢复氧化-抗氧化的平衡而防止疾病的发生。NQO1是一种同源二聚体黄素酶,够阻止环境胁迫剂对DNA造成氧化损伤且在保护内源性抗氧化剂中起重要作用。GST是体内解毒酶系统的重要组成部分,能将体内各种毒性物质降解并排出体外。当生物体遭受致癌物、氧化刺激等损伤时,GST可以发挥解毒和抗氧化作用<sup>[24]</sup>。但若Nrf2在受到刺激后一直处于高转录活性,使得下游具有抗氧化作用的靶基因NQO1,GST表达水平过高,则有可能导致机体始终处于过度抗氧化状态,而进一步破坏氧化-抗氧化平衡,导致疾病的发生甚至导致发育性致死<sup>[25]</sup>。CAG有可能发生肠化或不典型增生而进一步癌变。有研究发现Nrf2在胃癌组织及细胞中呈现高表达状态<sup>[26]</sup>,说明Nrf2过度活化可能导致胃黏膜由萎缩的癌前状态而发展为胃癌,对肿瘤发生有一定的促进作用。这时候就需要Keap1与Nrf2重新结合,恢复偶联状态并进入细胞质,之后Keap1将Nrf2与Cul3-E3泛素连接酶连接,促进Nrf2的泛素化和降解,关闭Nrf2通路,实现细胞稳态<sup>[27-28]</sup>。因此Keap1/Nrf2/ARE信号通路可作为治疗CAG,防止其癌变的潜在靶点之一。

本研究结果显示CAG大鼠胃黏膜组织Nrf2,

NQO1,GST蛋白及mRNA表达较正常组升高,胃黏膜萎缩,甚至肠化,处于癌前状态,说明在受到致癌物MNNG刺激后,Nrf2处于高转录活性状态,使得抗氧化蛋白表达过高,机体抗氧化过度,这可能是CAG发生的机制之一。维酶素组及半夏泻心汤高、中剂量组Nrf2,NQO1,GST蛋白及mRNA表达水平较模型组降低,胃黏膜萎缩、肠化情况明显改善,但半夏泻心汤低剂量组作用不明显,提示一定剂量的药物干预可以防止因异常刺激而导致的Nrf2高活性状态,下调过度表达的NQO1,GST,且以高剂量组改善最为明显,说明半夏泻心汤可能通过促使KEAP1和Nrf2重新结合并进入细胞质,促进Nrf2泛素化降解,从而关闭Nrf2通路,使细胞恢复稳态,恢复机体正常的氧化-抗氧化平衡状态,胃黏膜损伤恢复正常,起到治疗CAG,防止癌变的目的。随着半夏泻心汤浓度的升高,Nrf2泛素化降解速度加快,Nrf2信号通路被关闭,因此其下游靶基因NQO1,GST表达水平也随之降低。

综上所述,本研究表明CAG的发生可能与Keap1/Nrf2/ARE信号通路中Nrf2始终处于高转录活性,NQO1,GST等表达过高,机体处于过度抗氧化状态相关。半夏泻心汤能够明显修复受损的胃黏膜组织,其作用机制可能是降低Nrf2的转录活性,关闭Nrf2信号通路,降低NQO1,GST的表达水平,实现正常的氧化-抗氧化平衡,体现了中药调节机体内环境,恢复机体平衡状态而防治疾病的作用机制。且本研究发现半夏泻心汤高剂量组疗效更加显著,说明半夏泻心汤在治疗CAG方面存在明显的量效关系,为临床应用毒理学防治CAG提供了客观依据。但中药复方是通过多途径、多靶点而发挥治疗疾病的作用,半夏泻心汤中药味较多,具体是哪几味药的哪些成分通过调控信号通路而起到治疗CAG的效果尚不明确,且本研究只检测了CAG大鼠胃黏膜中Nrf2的表达量,不能明确半夏泻心汤是否真的能够促进Nrf2和KEAP1重新耦联并进入细胞质内从而关闭Nrf2通路,在今后的研究中可进行中药组分及细胞学的相关研究,以明确半夏泻心汤治疗CAG的具体作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 杨婕琳,赵东强. 消化系统恶性肿瘤与氧化应激关系的研究进展[J]. 胃肠病学,2015,20(2):113-115.
- [2] NAMANI A, LI Y, WANG X J, et al. Modulation of

- NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: Implications for cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(9):1875-1885.
- [3] 李宁. 香砂六君子汤对慢性萎缩性胃炎患者氧化应激及PG I、PG II的影响[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2020, 4(13):74-76.
- [4] 黄兹高, 黄律, 黄胜, 等. 黄芪建中汤合良附丸对慢性萎缩性胃炎患者胃黏膜血流量及血清氧化应激指标的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(18):1998-2002.
- [5] 陈稀烦, 骆瑛, 张丹. 参芪健胃颗粒对脾胃虚寒证慢性萎缩性胃炎患者的胃肠激素及氧化应激状况的影响[J]. *中国药物与临床*, 2020, 20(1):1-5.
- [6] 王国庆, 刘红军, 梁素芳. 益气活血方联合三联疗法对气虚血瘀型慢性萎缩性胃炎患者炎症反应和血流变学的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(1):182-186.
- [7] 高建华, 郑泽娜, 张静, 等. 半夏泻心汤治疗慢性萎缩性胃炎的临床效果[J]. *内蒙古中医药*, 2021, 40(3):3-4.
- [8] 张文军, 强锋. 半夏泻心汤联合胃复春治疗慢性萎缩性胃炎的临床效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2020, 5(35):157-159.
- [9] 门凯龙, 黄海量, 孙倩倩, 等. 半夏泻心汤加减方治疗Hp阳性慢性萎缩性胃炎疗效及安全性系统评价[J]. *山东中医杂志*, 2019, 38(9):833-838.
- [10] LIU Y, LI X, QIN X. *Saccharum Granorum* ameliorated mitochondrial dysfunction in chronic atrophic gastritis rats using organelle-specific metabolomics and network pharmacology approaches [J]. *Food Res Int*, 2020, 136:109503.
- [11] XIAO Y J, LI P Q, XIAO J Z, et al. Interventional effect of *Ginkgo biloba* extract on the progression of gastric precancerous lesions in rats [J]. *J Dig Dis*, 2010, 10(4):293-299.
- [12] 吴拓生. 半夏泻心汤联合西药治疗慢性萎缩性胃炎的效果和安全性[J]. *中外医学研究*, 2018, 16(35):33-35.
- [13] 彭林佳, 刁建新, 王琳琳. 半夏泻心汤药理作用研究进展[J]. *中国医药报*, 2019, 16(36):37-39.
- [14] 陈永灿, 杨汐茵, 陈宇, 等. 半夏泻心汤对慢性萎缩性胃炎大鼠炎症因子的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2019, 54(12):876-877.
- [15] 黄俊, 郑召鹏, 刘宁蓉, 等. 半夏泻心汤合香砂养胃丸加减对慢性萎缩性胃炎患者血清GAS、ET、ILs的影响[J]. *中药材*, 2019, 42(7):1682-1685.
- [16] 王菁, 杨冰, 李丽, 等. 半夏泻心汤联合胃复春对慢性萎缩性胃炎患者血清表皮生长因子及血清胃蛋白酶原、胃泌素表达影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(7):154-157.
- [17] 徐楚楚, 罗梦雪, 方霜霜, 等. 基于网络药理学探讨半夏泻心汤“异病同治”慢性萎缩性胃炎和失眠共同作用机制[J/OL]. *辽宁中医药大学学报*:1-12[2021-09-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.R.20210416.1012.014.html>.
- [18] 李晓强, 隋峰, 王洋, 等. Keap1-Nrf2/ARE信号通路在肿瘤中的双重作用及其与耐药性的关系[J]. *生物技术通讯*, 2019, 30(6):827-832.
- [19] DANILOVIC D, DE MELLO E S, FRAZZATO E, et al. Oncogenic mutations in KEAP1 disturbing inhibitory Nrf2-Keap1 interaction: activation of antioxidative pathway in papillary thyroid carcinoma [J]. *Head Neck*, 2018, 40(6):1271-1278.
- [20] 夏雪芬, 董施彬, 李兆云, 等. 基于Keap1-Nrf2/ARE信号通路的多糖对氧化损伤调控作用研究[J]. *中国科技信息*, 2021(9):73-74.
- [21] 杨非, 徐旖旎, 陈婷婷, 等. 环维黄杨星D调控Keap1-Nrf2信号改善醛固酮诱导的原代心肌细胞氧化应激损伤[J]. *中药材*, 2021, doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.01.031.
- [22] 胡流芳, 王迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(1):146-153.
- [23] 王春淼, 李玉洁, 李晶晶, 等. 参莲提取物通过调控Nrf2/Keap1信号通路减轻TNF- $\alpha$ 诱导的ECV304损伤[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(13):3402-3409.
- [24] 李波阳, 安晶晶, 俞诗源. 母鼠注射麻黄素对仔鼠肝组织结构和总抗氧化能力、谷胱甘肽转移酶活性及丙二醛含量的影响[J]. *解剖学杂志*, 2017, 40(2):137-140.
- [25] TSAKIRI E, GUMENI S, BENAKI D, et al. Hyperactivation of Nrf2 increases stress tolerance at the cost of aging acceleration due to metabolic deregulation [J]. *Aging Cell*, 2019, 18:e12845.
- [26] 沈磊, 张平平, 杨海涛. Keap1-Nrf2-ARE信号通路在胃癌癌细胞中的表达及意义[J]. *肿瘤学杂志*, 2019, 25(8):703-706.
- [27] 邵杰, 刘包欣子, 刘沈林. 中药结合西药治疗胃癌患者的临床疗效及对患者肿瘤标志物、免疫功能和生命质量的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(4):966-969, 973.
- [28] 石斌. 慢性萎缩性胃炎浊毒内蕴证与Hp感染及血清SOD、MDA、GSH-Px相关性研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.

[责任编辑 周冰冰]