

# 半夏泻心汤人含药血清对 HP 感染 GES-1 细胞 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的影响

黄彦平<sup>1</sup>, 詹达法<sup>2</sup>, 黄海<sup>1</sup>, 陈少芳<sup>1\*</sup>

(1. 福建中医药大学 中医学院, 福州 350122; 2. 福建中医药大学 药学院, 福州 350122)

**[摘要]** 目的:探讨半夏泻心汤人含药血清对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)感染人胃黏膜上皮 GES-1 细胞转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/信号转导蛋白(Smad)信号通路的影响,以揭示该方治疗消化性溃疡可能的作用机制。方法:GES-1 细胞分为空白组,HP 感染模型组,健康人血清组,雷贝拉唑血清组,用药前血清组,10% 半夏泻心汤血清组,20% 半夏泻心汤血清组。除空白组外,其余各组均接种 HP 造成幽门螺杆菌感染模型,采用雷贝拉唑、半夏泻心汤含药血清及用药前、健康人血清进行干预,24 h 后收集细胞及其上清液,噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖情况;蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 Smad2/3, Smad7, TGF- $\beta_1$  及磷酸化 Smad2/3(p-Smad2/3),磷酸化 Smad7(p-Smad7)蛋白的表达。结果:与空白组比较,HP 可明显抑制 GES-1 细胞的增殖,降低 GES-1 细胞内 Smad2/3, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2/3 蛋白表达,增加 Smad7 及 p-Smad7 蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与 HP 感染模型组比较,雷贝拉唑血清组及 10%、20% 半夏泻心汤血清组可明显降低 HP 对 GES-1 细胞增殖的抑制,增加 GES-1 细胞内 Smad2/3, TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 蛋白表达,并明显降低 Smad7, p-Smad7 蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与用药前血清组比较,加入雷贝拉唑、半夏泻心汤含药血清后均可降低 HP 对 GES-1 细胞增殖的抑制,其中雷贝拉唑血清组及 20% 半夏泻心汤血清组可增加 GES-1 细胞内 Smad2/3, TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 蛋白表达,降低 Smad7, p-Smad7 蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:半夏泻心汤能够减轻 HP 诱导 GES-1 细胞的损伤,促进 GES-1 细胞增殖,治疗 HP 相关性消化性溃疡,提高溃疡愈合质量,其机制可能与其调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路有关。

**[关键词]** 半夏泻心汤; 幽门螺杆菌; 人胃黏膜上皮 GES-1 细胞; 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) /信号转导蛋白 (Smad) 信号通路

**[中图分类号]** R22; R242; R273; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0091-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181117

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180316.0929.002.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-16 13:30

## Effect of Banxia Xiexin Tang Medicated Serum on HP-infected GES-1 Cells Through TGF- $\beta$ /Smad Signaling Pathway

HUANG Yan-ping<sup>1</sup>, CHAM TAT FATT<sup>2</sup>, HUANG Hai<sup>1</sup>, CHEN Shao-fang<sup>1\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China;

2. College of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Banxia Xiexin Tang medicated serum on the *Helicobacter pylori* (HP)-infected GES-1 cells through transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad signaling pathway to reveal the potential effect and mechanism of this prescription in treatment of heal peptic ulcer. **Method:** The GES-1 cells were divided into 7 groups, including blank control group, HP-infected model group, healthy human serum group, Rabeprazole serum group, pre-medicated serum group, 10% and 20% Banxia Xiexin Tang serum groups. Expect those in blank control group, HP was vaccinated in all the other groups to establish

**[收稿日期]** 20171027(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81403331);福建省自然科学基金项目(2014J01363)

**[第一作者]** 黄彦平,在读硕士,从事经方辨治疑难病研究,E-mail:402957521@qq.com

**[通信作者]** \*陈少芳,博士,副教授,硕士生导师,从事经方的临床与实验研究,Tel:0591-22861087,E-mail:csf2013@aliyun.com

helicobacter pylori model, and then Rabepazole serum, Banxia Xiexin Tang medicated serum and premedication serum and healthy human serum were adopted for intervention. After 24 hours, cells and their supernatant were collected, and methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to test the cell proliferation; the protein expression levels of Smad2/3, Smad7, transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and phosphorylated Smad2/3 (p-Smad2/3), phosphorylated Smad7 (p-Smad7) were detected by using Western blot. **Result:** As compared with the blank control group, HP significantly inhibited proliferation of GES-1 cells, decreased protein expression levels of Smad2/3, TGF- $\beta_1$  and p-Smad2/3 in GES-1 cells, and increased protein expression levels of Smad7 and p-Smad7 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with HP-infected model group, Rabepazole serum group and 10%, 20% Banxia Xiexin Tang serum groups obviously decreased the inhibition on proliferation of GES-1 cells, increased protein expression levels of Smad2/3, TGF- $\beta_1$  and p-Smad2/3 in GES-1 cells, and significantly decreased Smad7 and p-Smad7 protein expression levels ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with pre-medicated serum group, the inhibition on proliferation of GES-1 cells was decreased in Rabepazole serum group and Banxia Xiexin Tang serum groups; the protein expression levels of Smad2/3, TGF- $\beta_1$  and p-Smad2/3 in GES-1 cells were increased and the protein expression levels of Smad7 and p-Smad7 were decreased in Rabepazole serum group and 20% Banxia Xiexin Tang medicated serum group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Banxia Xiexin Tang alleviated HP-induced GES-1 cells injury, promoted GES-1 cells proliferation, and improved the curing quality of ulcers in the treatment of HP-associated peptic ulcer. The mechanism may be related to regulating the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway.

[ **Key words** ] Banxia Xiexin Tang; helicobacter pylori; human gastric epithelial GES-1 cells; transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) /Smad signaling pathway

消化性溃疡 (peptic ulcer, PU) 包括胃溃疡 (gastric ulcer, GU) 和十二指肠溃疡 (duodenal ulcer, DU), 该病是临床消化系统常见病、多发病之一, 具有明显的复发性。幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP) 感染为 PU 重要的发病原因和复发因素之一<sup>[1]</sup>。临床治疗 HP 感染多用质子泵抑制剂 (proton pump inhibitors, PPI) + 两种抗生素或铋剂 + 两种抗生素的三联方案。虽然 HP 相关消化性溃疡用西药治疗整体疗效尚可, 但 PPI 远期不良反应越来越受到关注, 尤其是髌骨骨折、艰难梭菌感染 (clostridium difficile infection, CDI) 相关性腹泻等, 对患者危害较大<sup>[2]</sup>, 且 HP 在特定环境下极易产生耐药性, 停药后复发率仍较高, 如何高效、彻底根除 HP 成为临床治疗消化性溃疡的迫切问题。近年来中医药在提高 HP 根除率及消化性溃疡愈合质量、预防复发等方面显示出一定优势<sup>[3]</sup>。有研究表明, 半夏泻心汤原方及其加减应用治疗 HP 和消化性溃疡具有良好效果<sup>[4]</sup>。亦有研究表明半夏泻心汤可使大鼠转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), 血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 的表达上调, 推测该方可能通过上调 TGF- $\beta_1$ , VEGF 等生长因子表达, 促进血管新生、组织修复、促进溃疡愈合, 并提高溃疡愈合质量<sup>[5-6]</sup>, 但其更深入的机制尚待明晰。为进一步探讨半夏泻心汤治疗

HP 相关性消化性溃疡可能的作用机制, 本研究以半夏泻心汤人含药血清对 HP 感染人胃黏膜上皮 GES-1 细胞进行干预, 观察该方对 GES-1 细胞 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的影响, 以探讨该经方治疗消化性溃疡可能的作用机制, 以期为临床根除 HP, 治疗消化性溃疡及提高消化性溃疡愈合质量提供更多的研究资料。

## 1 材料

**1.1 细胞及细菌** GES-1 细胞株购自中南大学高等研究中心细胞室, 批号 HTCC11。HP 采用国际标准株 NCTC11637 菌株 (cagA +), 由福建医科大学基础医学院病原生物学系余菲菲教授馈赠。

**1.2 药物及试剂** 半夏泻心汤由半夏 10 g, 干姜 10 g, 黄芩 10 g, 黄连 5 g, 人参 10 g, 大枣 10 g, 甘草 10 g, 共 7 味中药组成, 上述药物均购自福建中医药大学国医堂, 经由本校药学院中药教研室邱颂平教授鉴定为正品, 药物用量参考《伤寒论》所载药量比例计算; 煎药使用北京东华原 YFY-20 型密闭两煎煎药机, 药材浸泡 30 min 后, 第 1 煎加入 7 倍药质量的洁净清水, 煎药时间为 30 min, 2 煎加入 3 倍量的水, 煎药时间为 20 min; 2 次煎液混合后分装 2 袋, 每袋 150 mL, 含生药 0.217 g·mL<sup>-1</sup>, 早晚饭后半个小时各 1 袋, 口服, 每日 1 剂。雷贝拉唑钠肠溶片

(江苏豪森药业公司, 国药准字 H20020330); 克拉霉素缓释片(江苏恒瑞医药公司, 国药准字 H20031041); 甲硝唑片(华中药业公司, 国药准字 H42020388); 噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司, 批号 S33649); DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号分别为 1731328, 1581729); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术研究所, 批号 P0012A-2); Smad2, Smad3, Smad7,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(美国 Proteintech 公司, 批号分别为 12570-1-AP, 25494-1-AP, 25840-1-AP, 66009-1-Ig); p-Smad2 和 p-Smad3 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司, 批号分别为 21, 28); p-Smad7 单克隆抗体(北京博奥森公司, 批号 AF02249174A); TGF- $\beta_1$  单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号 I1310); RIPA 裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒, 辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔抗体, 辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠抗体(南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号分别为 602051, 421151, 723051, 723051)。

**1.3 仪器** 3100 Series II 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司); 96 孔细胞培养板(美国 Corning 公司); DMIL 型倒置立体显微镜(德国 Leica 公司); 洁净工作台(苏州净化设备有限公司); APC300 型电泳仪, Trans-Blot 小型转印槽转膜仪, ChemiDocXRS + 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清的制备和处理** 临床材料来源分 3 组, 分别是健康组、雷贝拉唑组和中药组。健康组来自福建中医药大学附属第二人民医院健康体检中心的健康志愿者 40 名, 男女各半, 年龄 20 ~ 50 岁。消化性溃疡各药物治疗组来自福建省附属第二人民医院消化内科 HP 相关性消化性溃疡之寒热错杂证患者, 随机双盲, 每组各 40 名, 男女各半, 年龄 20 ~ 50 岁, 签署知情同意书。雷贝拉唑组给予雷贝拉唑(10 mg) + 克拉霉素(0.5 g) + 甲硝唑(0.4 g), 1 日 2 次口服; 中药组给予半夏泻心汤液口服。各治疗组给予相应药物治疗前及治疗 7 d 后采静脉血; 血液标本室温静置后, 低温离心(1 万 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min)分离血清, 保存于 -80 °C 冰箱备用。

**2.2 HP, GES-1 细胞的培养及各实验组干预制备** GES-1 细胞培养在含 100 mg·L<sup>-1</sup> 的青霉素、链霉素和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中。置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中生长, 3 ~ 4 d 换液 1 次, 待生长至 80% ~ 90% 融合时, 以 0.25% 胰蛋白酶

消化, 进行传代培养。细胞与 HP 混合时选用无抗生素的高糖 DMEM 培养液。HP 传代再培养 2 d 后, 用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗并重悬, 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min, 弃上清液后, 用无血清无青霉素、链霉素的高糖 DMEM 培养液重悬, 调整细菌密度为 5 × 10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>, 用于 GES-1 细胞培养。GES-1 细胞分为空白组, HP 感染模型组, 健康人血清组, 雷贝拉唑血清组, 用药前血清组, 10%, 20% 半夏泻心汤血清组共 7 组。设无 HP 的 GES-1 细胞为空白组; 其余 6 组分别取 HP 与 GES-1 细胞混合(细菌-细胞数量 50:1)培养于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的湿润培养箱中, 24 h 后各干预组分别加入血清干预, 用药前血清组给予患者治疗前抽取的无含药血清, 雷贝拉唑血清组, 10%, 20% 半夏泻心汤血清组分别给予雷贝拉唑治疗者, 半夏泻心汤治疗者血清。

**2.3 MTT 比色法检测细胞增殖抑制率** GES-1 细胞以 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔板, 每孔含细胞悬液 100  $\mu$ L, 每组各设 5 个复孔, 共设 7 组(空白组, HP 感染模型组, 健康人血清组, 雷贝拉唑血清组, 用药前血清组, 10%, 20% 半夏泻心汤血清组)。细胞干预 24 h 后吸去上清液, 每孔加入 MTT 溶液 20  $\mu$ L, 37 °C 孵育 4 h 后, 吸去孔内上清液, 每孔加 DMSO 100  $\mu$ L, 震荡 10 min 后, 全自动酶标仪(检测波长 570 nm)读取各孔吸光度 A。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Smad2/3, Smad7, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2/3, p-Smad7 蛋白表达** 细胞分组干预 24 h 后, 加入 RIPA 裂解液及蛋白酶/磷酸酶抑制剂, 收集蛋白上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 99 °C 煮样 5 min 使蛋白变性。配制 10% SDS-PAGE 电泳凝胶, 加入各组蛋白样品, 经电泳分离蛋白后, 采用半干式电转仪将目的蛋白转移至 PVDF 膜上。膜蛋白面朝上 TBS 清洗, 室温封闭 1.5 h 后加入一抗(Smad2, Smad3, Smad7, TGF- $\beta_1$ , p-Smad2, p-Smad3, p-Smad7 抗体浓度分别为 1:1 000, 1:600, 1:500, 1:300, 1:1 000, 1:1 000, 1:300), 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 充分洗膜后, 加入相应 HRP 标记的二抗(1:5 000), 摇床室温孵育 1 h。TBST 充分洗膜后, 暗室中滴加 ECL 发光剂于膜上, 曝光、显影、定影, Quantity One 图像分析系统检测各目的蛋白灰度值, 以  $\beta$ -actin 为内参, 对比分析各目的蛋白表达水平。

**2.5 统计学分析** 应用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 One-way

ANOVA 方差分析, 方差齐时采用 LSD 法进行组间多重数据比较, 方差不齐时以 Games-Howell 法进行组间多重数据比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 半夏泻心汤含药血清对 GES-1 细胞增殖的影响** 与空白组比较, HP 感染后可显著抑制 GES-1 细胞的增殖 ( $P < 0.01$ ); 与 HP 感染模型组比较, 健康血清组干预后 GES-1 细胞的增殖无明显差异, 加入雷贝拉唑含药血清、半夏泻心汤含药血清干预后可显著降低 HP 对 GES-1 细胞增殖的抑制 ( $P < 0.01$ ); 与用药前比较, 加入雷贝拉唑含药血清及半夏泻心汤含药血清均可降低 HP 对 GES-1 细胞增殖的抑制 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 半夏泻心汤含药血清对 HP 感染的 GES-1 细胞增殖的影响  
Table 1 Effect of different experimental serums of Banxia Xiexin Tang on proliferation of HP-infected GES-1 cells

组别	体积分数 / %	$A_{570\text{ nm}}$ ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )	细胞增殖抑制率 / %
空白	-	0.871 6 ± 0.06	-
HP 感染模型	-	0.571 0 ± 0.04 <sup>1)</sup>	34.48
健康血清	-	0.559 2 ± 0.04	35.84
雷贝拉唑血清	10	0.703 6 ± 0.04 <sup>2,3)</sup>	19.27
用药前血清	-	0.580 0 ± 0.06	33.45
10% 中药血清	10	0.681 8 ± 0.03 <sup>2,3)</sup>	21.77
20% 中药血清	20	0.706 4 ± 0.06 <sup>2,3)</sup>	18.95

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 HP 感染模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与用药前血清组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 半夏泻心汤含药血清对 HP 感染的 GES-1 细胞 Smad2, Smad3, Smad7, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2, p-Smad3 蛋白表达的影响**

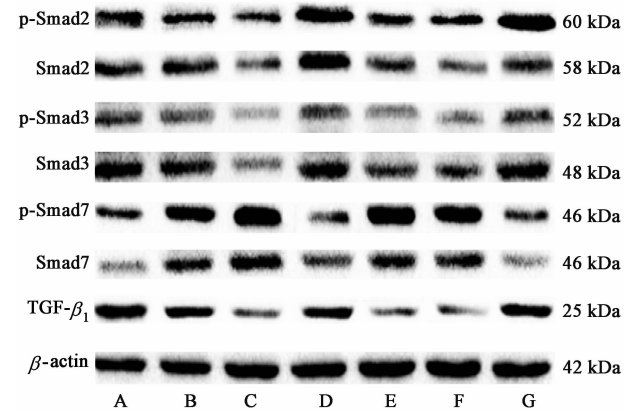
表 2 半夏泻心汤含药血清对 HP 感染的 GES-1 细胞中 Smad2, Smad3, Smad7, TGF- $\beta_1$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of different experimental serums of Banxia Xiexin Tang on protein expression levels of Smad2, Smad3, Smad7 and TGF- $\beta_1$  in HP-infected GES-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	体积分数 / %	Smad2/ $\beta$ -actin	Smad3/ $\beta$ -actin	Smad7/ $\beta$ -actin	TGF- $\beta_1$ / $\beta$ -actin
空白	-	1.26 ± 0.31	0.72 ± 0.04	0.46 ± 0.12	0.70 ± 0.13
HP 感染模型	-	0.84 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.38 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.93 ± 0.18 <sup>2)</sup>	0.38 ± 0.04 <sup>1)</sup>
健康血清	-	1.11 ± 0.27	0.67 ± 0.29	0.66 ± 0.05	0.58 ± 0.22
雷贝拉唑血清	10	1.48 ± 0.10 <sup>4,6)</sup>	0.85 ± 0.12 <sup>4,5)</sup>	0.37 ± 0.04 <sup>4,6)</sup>	0.70 ± 0.16 <sup>3,5)</sup>
用药前血清	-	0.91 ± 0.21	0.50 ± 0.14	0.91 ± 0.31	0.38 ± 0.03
10% 中药血清	10	1.28 ± 0.27 <sup>3)</sup>	0.74 ± 0.29 <sup>3)</sup>	0.49 ± 0.18 <sup>4)</sup>	0.67 ± 0.18 <sup>3)</sup>
20% 中药血清	20	1.44 ± 0.25 <sup>4,5)</sup>	0.95 ± 0.17 <sup>4,5)</sup>	0.45 ± 0.14 <sup>4,6)</sup>	0.68 ± 0.02 <sup>3,5)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 HP 感染模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; 与用药前血清组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

p-Smad3, p-Smad7 蛋白表达的影响 与空白组比较, HP 感染后 GES-1 细胞 Smad2, Smad3, TGF- $\beta_1$ , p-Smad2, p-Smad3 蛋白表达下降, Smad7, p-Smad7 蛋白表达增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与 HP 感染模型组比较, 健康人血清组各蛋白表达无明显差异, 雷贝拉唑含药血清及半夏泻心汤含药血清干预后 GES-1 细胞 Smad2, Smad3, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2, p-Smad3 蛋白表达均增加, Smad7 及 p-Smad7 蛋白表达减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与用药前血清组比较, 加入雷贝拉唑含药血清, 20% 半夏泻心汤含药血清干预后 GES-1 细胞 Smad2, Smad3, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2, p-Smad3 蛋白表达均增加, Smad7, p-Smad7 蛋白表达降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 1, 表 2, 3。



A. 20% 半夏泻心汤血清组; B. 10% 半夏泻心汤血清组; C. 用药前血清组; D. 雷贝拉唑血清组; E. 健康血清组; F. HP 感染模型组; G. 空白组

图 1 半夏泻心汤含药血清作用 GES-1 细胞后 Smad2/3, Smad7, TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, p-Smad7 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of different experimental serums of Banxia Xiexin Tang on protein expression levels of Smad2/3, Smad7, TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, and p-Smad7 in HP-infected GES-1 cells

表 3 半夏泻心汤含药血清对 HP 感染的 GES-1 细胞中 p-Smad2, p-Smad3, p-Smad7 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of different experimental serums of Banxia Xiexia Tang on protein expression levels of p-Smad2, p-Smad3, and p-Smad7 in HP-infected GES-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	体积分数/%	p-Smad2 / $\beta$ -actin	p-Smad3 / $\beta$ -actin	p-Smad7 / $\beta$ -actin
空白	-	1.21 $\pm$ 0.27	0.86 $\pm$ 0.25	0.74 $\pm$ 0.10
HP 感染模型	-	0.70 $\pm$ 0.15 <sup>2)</sup>	0.50 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	1.22 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>
健康血清	-	0.93 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.14	0.89 $\pm$ 0.36
雷贝拉唑血清	10	1.39 $\pm$ 0.06 <sup>4,6)</sup>	0.93 $\pm$ 0.10 <sup>3,5)</sup>	0.58 $\pm$ 0.03 <sup>4,5)</sup>
用药前血清	-	0.88 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.13	0.93 $\pm$ 0.30
10% 中药血清	10	1.24 $\pm$ 0.06 <sup>4)</sup>	0.85 $\pm$ 0.17 <sup>3)</sup>	0.68 $\pm$ 0.19 <sup>4)</sup>
20% 中药血清	20	1.44 $\pm$ 0.21 <sup>4,6)</sup>	1.12 $\pm$ 0.33 <sup>4,6)</sup>	0.57 $\pm$ 0.03 <sup>4,5)</sup>

#### 4 讨论

HP 是一种寄生于人体胃黏膜的革兰氏阴性微需氧菌。近年来人们逐渐发现 HP 的感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤和胃癌等疾病的发生发展密切相关。较为公认的 PU 的发病机制为 HP 感染、胃酸及胃蛋白酶等损伤因子和黏膜自身保护能力的降低<sup>[7]</sup>。

消化性溃疡多归属于中医脾胃病胃脘痛痞病范畴。《黄帝内经·素问·痺论》说：“饮食自倍，脾胃乃伤。”《黄帝内经·素问·阴阳应象大论》云：“水谷之寒热，感则害于六腑。”饮食不节，过食生冷，气候变化，寒温不适为胃脘痛之外因。清朝沈金鳌强调指出：“胃病邪干胃脘病也”，“唯肝气相乘为尤甚。”尤在泾说：“忧思愤怒蓄於中，不待条达”，说明七情郁结，情志不畅，恼怒忧郁伤肝之气，肝失条达，乘胃犯脾，气机阻塞，胃失和降为导致本病的内因。中医药治疗消化性溃疡具有丰富的经验。临床上消化性溃疡中医证型以寒热错杂证居多，半夏泻心汤是治疗该病证的有效验方。大量的临床报道也证实了该方治疗消化性溃疡的可靠疗效<sup>[8-9]</sup>。半夏泻心汤出自东汉张仲景的《伤寒论》：“但满而不痛者，此为痞，柴胡不中与之，宜半夏泻心汤。”该方由半夏、干姜、黄芩、黄连、人参、大枣和炙甘草 7 味药组成。方中半夏为辛温之品，散结除痞，降逆止呕，为君药。干姜辛热温中散寒，助半夏散寒结；黄芩、黄连苦寒泄热开痞，三者共为臣药。然寒热互结，缘于中虚失运，故方中用人参、大枣甘温益气补脾虚，是为佐药。炙甘草既助佐药补脾和中，又调和诸药，为使药。诸药相合，使其具有寒热互用和阴阳，苦辛并进调

升降，补泻兼施顾虚实的配伍特点，故寒热得解，升降复常，则痞满呕利诸症自愈。

国内外学者通过对细胞因子的广泛研究发现，许多细胞因子与 PU 的发生、发展、愈合过程密切相关，它们构成了复杂的细胞因子网络，相互促成或抑制，从而在消化性溃疡的发病过程中发挥作用。TGF- $\beta$  是一类多功能的细胞因子，由多种组织细胞合成，调控着细胞周期，影响细胞的增殖、分化和凋亡，与人类多种疾病包括消化性溃疡密切相关。TGF- $\beta$  超家族与其相应的受体、胞内信号转导分子，主要是 Smad 蛋白家族，组成一个影响疾病发生和发展的信号通路，调节靶基因的转录。TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路在机体组织中生物学作用广泛，与 PU 的发生发展密切相关<sup>[10]</sup>。TGF- $\beta$  是调节细胞生长和分化的关键因子，在消化道胃肠上皮细胞的增殖和分化中具有重要作用，并对胃肠黏膜炎症有显著的负调控作用。TGF- $\beta$  通路表达的异常将导致胃肠道炎症、溃疡乃至恶性疾病的发生<sup>[11-12]</sup>。TGF- $\beta$  及其调控的信号通路在维护胃肠黏膜屏障完整性方面具有重要作用<sup>[13-14]</sup>。本研究以半夏泻心汤人含药血清对 HP 感染人胃黏膜上皮细胞 GES-1 进行干预，研究结果表明，与空白组比较，HP 感染后可显著抑制 GES-1 细胞的增殖，降低 GES-1 细胞内 Smad2/3, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2/3 蛋白的表达，增加 Smad7 及 p-Smad7 蛋白表达；与 HP 感染模型组比较，10%、20% 半夏泻心汤含药血清组均可显著降低 HP 对 GES-1 细胞增殖的抑制，增加 Smad2/3, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2/3 蛋白的表达，并显著降低 Smad7 及 p-Smad7 蛋白表达；与用药前血清组比较，加入半夏泻心汤含药血清后可降低 HP 对 GES-1 细胞增殖的抑制，其中 20% 半夏泻心汤含药血清组可增加 Smad2/3, TGF- $\beta_1$  及 p-Smad2/3 蛋白的表达，降低 Smad7 及 p-Smad7 蛋白表达，提示半夏泻心汤能够减轻 HP 诱导 GES-1 细胞的损伤，促进 GES-1 细胞增殖，治疗 HP 相关性消化性溃疡，提高溃疡愈合质量，其机制可能与其调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路有关。半夏泻心汤对 HP 诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用和可能机制仍需进一步深入研究。

#### [参考文献]

[1] 袁耀宗. 消化性溃疡诊断与治疗规范(2016 年, 西安) [J]. 中华消化杂志, 2016, 36(8): 508-513.

[2] 冯跃, 张澍田. 质子泵抑制剂使用的远期不良反应 [J]. 中华消化杂志, 2015, 35(8): 567-570.

- [ 3 ] 陆凤鸣,李春婷. 中医药提高消化性溃疡愈合质量的研究进展[J]. 河南中医,2009,29(3):306-308.
- [ 4 ] 赵勇,邱峰. 半夏泻心汤联合三联疗法治疗消化性溃疡伴HP感染临床研究[J]. 山东中医杂志,2015,34(1):38-40.
- [ 5 ] 陈少芳,江月斐,彭孝纬,等. 半夏泻心汤对胃溃疡大鼠生长因子表达的影响[J]. 福建中医学院学报,2010,20(1):22-24.
- [ 6 ] 江月斐,李奕祺,陈少芳,等. 半夏泻心汤加味对模型大鼠胃溃疡愈合的影响[J]. 福建中医学院学报,2009,19(5):55-56.
- [ 7 ] BAO Y, Spiegelman D, LI R, et al. History of peptic ulcer disease and pancreatic cancer risk in men[J]. Gastroenterology,2009,138(2):541-549.
- [ 8 ] 徐琰. 半夏泻心汤加味治疗消化性溃疡80例[J]. 山东中医杂志,2015,34(8):590-591.
- [ 9 ] 邓天好,谭达全,龙承星,等. 半夏泻心汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎与消化性溃疡的Meta分析[J]. 湖南中医杂志,2015,31(10):134-136,139.
- [ 10 ] Tanigawa T, Pai R, Arakawa T, et al. TGF-beta signaling pathway: its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing[J]. J Physiol Pharmacol, 2005,56(1):3-13.
- [ 11 ] 宋银枝,莫润田,李茂清,等. 康胃愈溃汤对老年消化性溃疡患者胃黏膜TGF- $\beta_1$ 和Smad4表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(9):789-791.
- [ 12 ] 刘玺,郑勇,陈卫刚. TGF- $\beta$ /Smads通路及其Smad4基因在胃癌中的研究现状[J]. 医学综述,2013,19(21):3841-3843.
- [ 13 ] 罗吉,罗燕,李勇敏,等. 健脾消癌方对结肠癌TGF- $\beta$ /lncRNA-ATB/miR-200a信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):161-166.
- [ 14 ] Jo Y, Han S U, Kim Y J, et al. Suppressed gastric mucosal TGF- $\beta_1$  increases susceptibility to *H. pylori*-induced gastric inflammation and ulceration: a stupid host defense response[J]. Gut Liver, 2010, 4(1):43-53.

[责任编辑 张丰丰]