

# 白及多糖对 GU 模型大鼠胃组织 PI3K/Akt 的影响

巩子汉<sup>1,2</sup>, 王艳威<sup>3</sup>, 段永强<sup>1,2,4\*</sup>, 王强<sup>1\*</sup>, 付晓艳<sup>1</sup>, 白敏<sup>1</sup>, 马骏<sup>1</sup>, 白彦丽<sup>1</sup>, 司晓丽<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730020;  
3. 北京市隆福医院, 北京 100010; 4. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

**[摘要]** 目的: 探讨白及多糖对胃溃疡(GU)模型大鼠胃组织磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K), 蛋白激酶B(Akt)mRNA及蛋白, 以及其介导细胞因子白细胞介素-2受体(IL-2R), 白细胞介素-4(IL-4)表达水平的影响。方法: 将60只SPF级Wistar大鼠随机分为空白组和模型组, 模型组大鼠采用乙酸直接烧灼法复制GU模型, 将GU模型大鼠按随机数字表法分为模型组、盐酸雷尼替丁组和白及多糖高、中、低剂量组共5组, 每组10只。空白组和GU模型组大鼠给予10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>蒸馏水灌胃, 白及多糖高、中、低剂量组分别予0.5, 0.25, 0.125 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>白及多糖灌胃, 盐酸雷尼替丁组给予0.3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>盐酸雷尼替丁灌胃, 治疗15 d。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测各组大鼠血清一氧化氮(NO)含量及胃组织胃蛋白酶活性及细胞因子IL-2R, IL-4含量, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测胃溃疡病灶组织PI3K及Akt mRNA表达水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃溃疡病灶组织PI3K及Akt蛋白表达水平。结果: 与空白组比较, 胃组织细胞因子IL-2R, IL-4含量及mRNA表达显著升高, PI3K, Akt mRNA及蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ ); 与GU模型组比较, 白及多糖高、中、低剂量组IL-2R, IL-4含量及mRNA表达均降低, 以白及多糖高剂量组降低显著, PI3K, Akt mRNA及蛋白表达水平均降低, 以白及多糖高、中剂量组降低显著( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 白及多糖可通过下调PI3K及Akt mRNA和蛋白表达水平, 抑制细胞因子IL-2R及IL-4异常分泌而发挥保护胃黏膜的作用。

**[关键词]** 白及多糖; 胃溃疡; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K); 蛋白激酶B(Akt); 白细胞介素-2受体(IL-2R); 白细胞介素-4(IL-4)

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)06-0052-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200304

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20191021.1556.011.html>

**[网络出版时间]** 2019-10-21 17:19

## Effect of Bletillae Rhizoma Polysaccharide on PI3K/Akt in Gastric Tissue of GU Model Rats

GONG Zi-han<sup>1,2</sup>, WANG Yan-wei<sup>3</sup>, DUAN Yong-qiang<sup>1,2,4\*</sup>, WANG Qiang<sup>1\*</sup>,

FU Xiao-yan<sup>1</sup>, BAI Min<sup>1</sup>, MA Jun<sup>1</sup>, BAI Yan-li<sup>1</sup>, SI Xiao-li<sup>1</sup>

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation under Ministry of Education, Lanzhou 730020, China;

3. Beijing Longfu Hospital, Beijing 100010, China;

4. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology for Traditional Chinese Medicines of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Bletillae Rhizoma polysaccharide on the expressions of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) gene protein and its mediated cytokines interleukin-2 receptor (IL-2R) and interleukin-4 (IL-4) in gastric tissue of rats with gastric ulcer (GU). **Method:** Sixty SPF

**[收稿日期]** 20190705(008)

**[基金项目]** 甘肃省教育厅高等学校科研项目(2018A-044); 研究生创新基金项目(2019CX40)

**[第一作者]** 巩子汉, 硕士, 从事敦煌医学文献及脾胃学术思想与临床应用研究, E-mail: 1217253647@qq.com

**[通信作者]** \* 段永强, 博士, 教授, 博导, 从事中医老年病、脾胃病和敦煌古医方研究, E-mail: dyqgs2008@163.com;

\* 王强, 硕士, 从事中医脾胃病研究, E-mail: wqgs2012@163.com

Wistar rats were randomly divided into blank group and model group. The GU model was replicated by direct acetic acid cauterization in model group. The GU model rats were randomly divided into five groups: model group, positive control group, and large, medium and small-dose Bletillae Rhizoma polysaccharide groups, with 10 rats in each group. Rats in blank group and GU model group were given  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  distilled water by gavage, rats in large, medium and small-dose groups were given  $0.5, 0.25, 0.125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  Bletillae Rhizoma polysaccharide by gavage, while rats in positive control group were given  $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ranitidine by gavage for 15 days. Serum nitric oxide (NO) content, pepsinase activity and cytokines IL-2R and IL-4 levels in rats of each group were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), PI3K and Akt mRNA expressions were detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and PI3K and Akt protein expressions were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the contents and gene expressions of cytokines IL-2R and IL-4 in gastric tissue were significantly increased, and the PI3K and Akt genes and protein expressions were significantly increased, with statistical significance ( $P < 0.01$ ). Compared with GU model group, the content and gene expressions of IL-2R and IL-4 in large, medium and small-dose Bletillae Rhizoma polysaccharide groups were decreased significantly, and the PI3K and Akt gene and protein expressions were decreased significantly in large-dose Bletillae Rhizoma polysaccharide group, while those in large and medium-dose Bletillae Rhizoma polysaccharide groups were decreased significantly ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Bletillae Rhizoma polysaccharide can protect gastric mucosa by down-regulating PI3K and Akt gene and protein expressions and inhibiting abnormal secretion of cytokines IL-2R and IL-4.

[**Key words**] Bletillae Rhizoma polysaccharide; gastric ulcer; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K); protein kinase B (Akt); interleukin-2 receptor (IL-2R); interleukin-4 (IL-4)

胃溃疡(GU)作为一种常见多发的消化性溃疡疾病,临床迁延难愈、易反复发作<sup>[1-2]</sup>。研究表明物理刺激及化学反应等均可致使胃黏膜发生氧化应激损伤、促炎症细胞因子的大量释放,均是胃溃疡发病的主要因素<sup>[3-5]</sup>。白及味苦性微寒,有止血消肿,生肌敛疮之功,常与黄连、贝母、轻粉等配伍可治疗疮痍已溃,久不收口者,正如《神农本草经》所载:“白及味苦,主痈肿,败疽,胃中邪气,恶疮不收”。更有《古今医彻·卷二》记载白及汤具有收敛止血之功效,主治消化性溃疡出血等症。白及的主要化学成分为白及多糖已得到广泛认可<sup>[6]</sup>,其可促进大鼠胃溃疡创面的愈合,其机制可能与白及多糖可以提高创面羟脯氨酸的量,促进创面组织中纤维细胞、血管内皮细胞的增生,提高创伤巨噬细胞的量有关<sup>[7]</sup>。本实验研究白及多糖对 GU 模型大鼠胃溃疡面积、溃疡愈合率及血清一氧化氮(NO)含量及胃蛋白酶活性的影响,胃组织磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K),蛋白激酶 B(Akt)mRNA 及蛋白的表达水平及下游细胞因子白细胞介素(IL)-2R,IL-4 含量的干预效应,进一步探讨白及多糖治疗 GU 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级健康 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,2 月龄,体质量( $180 \pm 10$ )g,甘肃中医药大学医

学实验中心提供,动物合格证号 SCXK(甘)2015-0002。于甘肃中医药大学 SPF 级实验室常规饲养,相对湿度 45%~55%,室温(22~25)℃,自由饮水进食。实验动物处理遵守实验动物伦理原则。

**1.2 药物及试剂** 白及多糖(含量 99%,西安泽郎生物科技有限公司,批号 XAZL171026-1);盐酸雷尼替丁(湖南汉森制药股份有限公司,批号 1808202);将白及多糖按 0.5,0.25,0.125 g 溶于 10 mL 双蒸水中,分别制成  $0.5, 0.25, 0.125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量,盐酸雷尼替丁按 0.3 g 溶于 10 mL 双蒸水中,制成  $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量,分别置于 4℃ 冰箱以备灌胃使用。Albumin Bovine V, 30% 制胶液, Tris 6.8, PMSF, SDS, Glycine, TRIS, Tris 8.8(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 829Q052, 20180927, 20180322, 20171113, 1029H033, 903L062, 929Y071, 20180928);乙醇,冰乙酸(天津市富宇精细化工有限公司,批号分别为 20180222, 20170327);IL-2R, IL-4 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海将来实业股份有限公司,批号均为 201901);trizol(美国 Ambion 公司,批号 T152104);反转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AI40704A, AI61180A);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体

(美国 ImmunoWay 公司,批号 B1501);PI3K, Akt 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 GR3192684-9, GR3192605-11);辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物科技有限公司,批号 112971);无核酸酶水(美国 Promega 公司,批号 0000277459);pagemuler 预染蛋白阶梯[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号 00442922]。

**1.3 仪器** CT14RD 型高速低温离心机(上海天美生化仪器设备工程公司);HH-4 型数显恒温水浴箱(江苏省金坛市友联仪器研究所);Benchmark Plus 型酶联免疫检测仪, BIOMATE 3S 型核酸蛋白测定仪, S1000TM 型逆转录仪, Chemi DOC XRS + 型凝胶成像分析系统, CFX96TM Optics Module 型 Real-time PCR 仪, JY-SPAT 型电泳槽, PowerPac™ Universal Power Supply 型电泳及转印电源(美国 Bio-Rad 公司);SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与模型制备** 将 60 只 SPF 级 Wistar 大鼠适应性饲养 3 d 后按随机分为空白组(10)与模型组(50),待造模成功后按随机数字表法分为模型组、盐酸雷尼替丁组、白及多糖高、中、低剂量组共 5 组,每组 10 只。参照文献[8]方法造模:大鼠术前禁食不禁水 24 h,10%水合氯醛溶液  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量腹腔内注射麻醉,常规固定、备皮、消毒后,自剑突下沿腹中线切开腹壁约 2 cm 打开腹腔,自肝脏后剥离出胃,暴露胃前壁窦体部,自制直径为 5 mm,长为 40 mm 的圆柱状装置按置于胃前壁胃窦部浆膜层处,吸取 20  $\mu\text{L}$  冰乙酸注入圆柱状装置中,直接烧灼 60 s,再用生理盐水清洗创口,操作完毕后覆盖网膜,间断缝合腹膜、腹壁各层组织、皮肤。待造模 3 d 后,随机抽取 3 只大鼠麻醉后脱臼处死,肉眼观察其病灶处有无溃疡,周边是否充血水肿。

**2.2 给药方法** 确定 GU 模型制备成功后空白组及 GU 模型组大鼠给予等容积蒸馏水灌胃,阳性对照组( $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )盐酸雷尼替丁灌胃,2015 年版《中国药典》一部中,白及生药饮片成人用量 6 ~ 15  $\text{g}^{[9]}$ ,按每天平均用药量 10 g 折算成大鼠的用量为生药  $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,但是受白及药材产地、采收季节等影响,白及多糖含量差异较大[(33.11% ~ 48.07%) $^{[10]}$ , (2.45% ~ 23.57%) $^{[11]}$ ],综合考虑确定大鼠白及多糖的给药剂量  $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,因此本实验选取大鼠给予白及多糖 0.5, 0.25, 0.125  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  作为高、中、低剂量组进行灌胃,1 次/天,连续 15 d。

**2.3 动物取材** 取材前 24 h 禁食不禁水,用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,经腹主动脉采血 4 mL 并取出胃组织。将胃组织纵切成 3 份,一份加 10 倍量生理盐水匀浆,  $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取上清,冻存备用; -80  $^{\circ}\text{C}$  保存待检基因蛋白;一份置于 10% 多聚甲醛固定液中,送病理检测。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 溃疡面积和溃疡愈合率的检测** $^{[12-13]}$  麻醉处死大鼠后摘取全胃并沿胃大弯剪开胃腔,将胃黏膜面衬以白纸并铺平,肉眼观察病变程度,并用游标卡尺测定溃疡尺寸,计算溃疡面积和抑制率。溃疡面积( $\text{mm}^2$ ) =  $\pi \times$  长径  $\times$  短径/4, 溃疡愈合率(%) = (模型组溃疡面积 - 给药组溃疡面积)/模型组溃疡面积  $\times 100\%$ 。

**2.4.2 ELISA 检测** 各组大鼠血清 NO 及胃组织匀浆液中胃蛋白酶活性, IL-2R, IL-4 含量 麻醉各组大鼠后采取血样,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后吸取血清;称取各组大鼠胃组织样本 0.1 g 置于离心管中,加入 0.9 mL 生理盐水后充分匀浆,离心取上清液保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。遵照说明书按步骤检测大鼠血清 NO 及胃组织匀浆液中胃蛋白酶活性, IL-2R, IL-4 含量。将试剂盒和待测血清及胃组织上清液平衡至室温,稀释准备对照品和洗涤液,按要求加样、温育、洗涤、温育、洗涤、显色、终止。酶标仪内测定 450 nm 波长时各孔吸光度 A,并绘制标准曲线,计算样品含量。

**2.4.3 Real-time PCR 检测** 各组大鼠胃组织 PI3K, Akt mRNA 表达水平 称取各组大鼠胃组织样本 0.1 g 置于离心管中,加入 trizol 1.0 mL 后于冰上研磨均匀,静置 5 min 后低温离心( $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min),吸取上清液,冰育 5 min 后加三氯甲烷 0.2 mL,震荡低温离心( $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 min);吸取上清液,加入异丙醇 0.5 mL,混匀、冰育 10 min 后低温离心[ $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min, 离心半径 16 cm (下同)],弃上清,所留淡乳白色沉淀即为 RNA;加乙醇(75%)1 mL,混匀后低温离心( $1\ \text{万} \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min),弃上清并低温干燥;再加入无核酸酶水 50  $\mu\text{L}$  溶解总 RNA。于核酸定量分析仪测定 RNA 浓度,且(260 nm 处 A)/(280 nm 处 A)均在 1.8 ~ 2.0。进行 cDNA 反转程序,PCR 扩增 PI3K 及 Akt 基因片段。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参基因,反应体系及参数依据 Real-time PCR 试剂盒说明书设置,反应参数为预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  2 min,变性 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,退火

60 °C 60 s, 循环 40 次, 终末延伸 65 °C 5 s 95 °C。连续检测荧光并记录扩增曲线, 采用样点拟合法分析结果得到目的基因和  $\beta$ -actin 的  $C_t$  值, 以  $\beta$ -actin 为内参, 用比较  $C_t$  值法计算相对表达量, 相对表达量为  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物设计与合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度/bp
$\beta$ -actin	上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	150
	下游 5'-GACTCATCGTACTCTGCTGTGCTG-3'	
Akt	上游 5'-ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA-3'	126
	下游 5'-GCCCTTGTCCAGTAGCTTCA-3'	
PI3K	上游 5'-CTGGAGAGCTTGGAGGACGA-3'	159
	下游 5'-TCGCAAGAACCAGAATAAGAAGTG-3'	

**2.4.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组大鼠胃组织 PI3K, Akt 蛋白表达水平** 于离心管中称取胃组织 0.1 g, 加入现配裂解液 (10  $\mu$ L PMSF + 490  $\mu$ L RIPA) 500  $\mu$ L, 充分剪碎后于冰板上充分匀浆后, 冰浴 10 min 充分裂解后, 低温高速离心 (13 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min) 取上清液 100  $\mu$ L 运用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。另取上清液 300  $\mu$ L, 加入 4 倍上样缓冲液, 混均水浴变性 (100 °C, 10 min), -20 °C 保存。SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, GAPDH 抗体溶液配制 (1:1 000), GAPDH 抗体 10  $\mu$ L, 封闭液 10 mL; PI3K 抗体配制 (1:2 000), PI3K 抗体 5  $\mu$ L, 封闭液 10 mL; Akt 抗体配制 (1:1 000), Akt 抗体 10  $\mu$ L, 封闭液 10 mL; 37 °C 摇床 4 h, TBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记羊抗兔二抗, 二抗溶液配制: 辣根酶标记山羊抗兔 (1:5 000): 山羊抗兔二抗 2  $\mu$ L, 牛奶封闭液 10 mL; 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 采用化学发光底物进行化学发光, 显影后用 Bio-Rad Quantity one 图像分析软件进行扫描分析。

**2.5 统计学处理** 采用 SPSS 24.0 软件统计进行分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数差异的比较用方差分析, 方差齐用 SLD 法比较, 方差不齐用 Tamhane's  $T_2$  法比较, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 GU 大鼠溃疡面积和溃疡愈合率的影响** 与空白组比较, GU 模型大鼠溃疡面积显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 GU 模型组比较, 各给药组大鼠胃黏

膜损伤程度逐步减轻, 白及多糖高剂量组和盐酸雷尼替丁组大鼠溃疡面积降低 ( $P < 0.01$ ); 白及多糖低剂量组大鼠溃疡面积降低, 差异无统计学意义。见表 2。

表 2 白及多糖对 GU 大鼠溃疡面积和溃疡愈合率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Table 2 Effects of Bletillae Rhizoma polysaccharide on ulcer area and ulcer healing rate of Bletillae Rhizoma polysaccharide GU rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	溃疡面积/ $\text{mm}^2$	溃疡愈合率/%
空白	-	0	-
GU 模型	-	19.67 $\pm$ 2.94 <sup>1)</sup>	-
盐酸雷尼替丁	0.300	12.50 $\pm$ 1.87 <sup>3)</sup>	36.44
白及多糖	0.500	11.33 $\pm$ 3.44 <sup>3)</sup>	42.37
	0.250	15.83 $\pm$ 2.14	16.95
	0.125	17.67 $\pm$ 2.80	10.17

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 GU 模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 ~ 5 同)。

**3.2 对 GU 大鼠血清 NO 及胃组织胃蛋白酶活性, IL-2R, IL-4 含量的影响** 与空白组比较, GU 模型组大鼠血清 NO 及胃组织胃蛋白酶活性, IL-2R, IL-4 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 GU 模型组比较, 各给药组大鼠血清 NO 及胃组织胃蛋白酶活性, IL-2R, IL-4 含量降低, 白及多糖高剂量组和盐酸雷尼替丁组大鼠血清 NO 及胃组织胃蛋白酶活性, IL-2R 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 白及多糖中、低剂量组血清 NO 及胃组织胃蛋白酶活性, IL-2R 含量降低, 差异无统计学意义; 白及多糖高、中剂量组 IL-4 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 白及多糖低剂量组 IL-4 含量降低, 差异无统计学意义。见表 3。

**3.3 对 GU 模型大鼠胃组织 PI3K, Akt mRNA 表达水平的影响** 与空白组比较, GU 模型组大鼠胃组织 PI3K 及 Akt mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 GU 模型组比较, 各给药组大鼠胃组织 PI3K 及 Akt mRNA 表达水平均降低, 白及多糖高、中剂量组和盐酸雷尼替丁组大鼠胃组织 PI3K 及 Akt mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 白及多糖低剂量组大鼠胃组织 PI3K 及 Akt mRNA 表达水平降低, 差异无统计学意义。见表 4。

**3.4 对 GU 大鼠胃组织 PI3K 及 Akt 蛋白表达水平的影响** 与空白组比较, GU 模型组大鼠胃组织 PI3K 及 Akt 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 GU 模型组比较, 各给药组大鼠胃组织 PI3K 及 Akt 蛋白表达水平均降低, 白及多糖高剂量组和盐酸雷尼替丁组大鼠胃组织 PI3K 蛋白表达水平显著降低

表 3 白及多糖对 GU 大鼠血清 NO 及胃组织胃蛋白酶活性, IL-2R, IL-4 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of Bletillae Rhizoma polysaccharide on serum NO and gastric tissue pepsinase activity, IL-2R and IL-4 contents in GU rats

( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NO/U·mL <sup>-1</sup>	胃蛋白酶/ng·g <sup>-1</sup>	IL-2R/ng·g <sup>-1</sup>	IL-4/ng·g <sup>-1</sup>
空白	-	14.17 ± 2.14	209.83 ± 18.50	2.42 ± 0.34	3.25 ± 0.19
GU 模型	-	25.67 ± 2.50 <sup>1)</sup>	254.50 ± 20.55 <sup>1)</sup>	3.01 ± 0.12 <sup>1)</sup>	3.75 ± 0.18 <sup>1)</sup>
盐酸雷尼替丁	0.300	21.67 ± 2.94 <sup>2)</sup>	223.83 ± 13.98 <sup>2)</sup>	2.66 ± 0.20 <sup>2)</sup>	3.45 ± 0.25 <sup>2)</sup>
白及多糖	0.500	20.83 ± 4.17 <sup>3)</sup>	216.67 ± 23.42 <sup>3)</sup>	2.57 ± 0.18 <sup>3)</sup>	3.41 ± 0.28 <sup>3)</sup>
	0.250	23.17 ± 1.72	235.33 ± 23.57	2.77 ± 0.26	3.43 ± 0.14 <sup>2)</sup>
	0.125	24.83 ± 2.04	245.50 ± 15.22	2.88 ± 0.30	3.67 ± 0.12

表 4 白及多糖对 GU 大鼠胃组织 PI3K 及 Akt mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Bletillae Rhizoma polysaccharide on PI3K and Akt mRNA expression in gastric tissues of GU rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PI3K	Akt
GU 模型	-	1.37 ± 0.036 <sup>1)</sup>	1.34 ± 0.039 <sup>1)</sup>
盐酸雷尼替丁	0.300	1.26 ± 0.046 <sup>2)</sup>	1.20 ± 0.015 <sup>2)</sup>
白及多糖	0.500	1.22 ± 0.027 <sup>3)</sup>	1.14 ± 0.009 <sup>3)</sup>
	0.250	1.27 ± 0.019 <sup>2)</sup>	1.25 ± 0.029 <sup>3)</sup>
	0.125	1.35 ± 0.034	1.31 ± 0.085

注:空白组各指标 mRNA 表达量均设为 1。

( $P < 0.01$ ), 白及多糖中、低剂量组大鼠胃组织 PI3K 蛋白表达水平降低, 差异无统计学意义; 白及多糖高、中剂量组和盐酸雷尼替丁组大鼠胃组织 Akt 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 白及多糖低剂量组大鼠胃组织 Akt 蛋白表达水平降低, 差异无统计学意义。见表 5, 图 1。

表 5 白及多糖对 GU 大鼠胃组织 PI3K 及 Akt 蛋白表达水平影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Bletillae Rhizoma polysaccharide on expression of PI3K and Akt protein in gastric tissues of GU rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH
空白	-	0.41 ± 0.044	0.42 ± 0.038
GU 模型	-	0.68 ± 0.038 <sup>1)</sup>	0.63 ± 0.030 <sup>1)</sup>
盐酸雷尼替丁	0.300	0.53 ± 0.038 <sup>3)</sup>	0.43 ± 0.014 <sup>3)</sup>
白及多糖	0.500	0.43 ± 0.023 <sup>3)</sup>	0.44 ± 0.025 <sup>3)</sup>
	0.250	0.65 ± 0.050	0.59 ± 0.028 <sup>2)</sup>
	0.125	0.67 ± 0.036	0.61 ± 0.040

#### 4 讨论

胃溃疡是一种常见多发病, 临床上以周期性、节律性的上腹部疼痛为主要表现, 对于胃溃疡病因的认识, 幽门螺杆菌 (HP) 感染、非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 的使用、缺血、应激、压力、酒精摄入、吸烟和营养不足等因素均可诱发胃溃疡<sup>[14]</sup>。白及味苦性微寒, 有止血消肿, 生肌敛疮之功, 常与黄连、贝

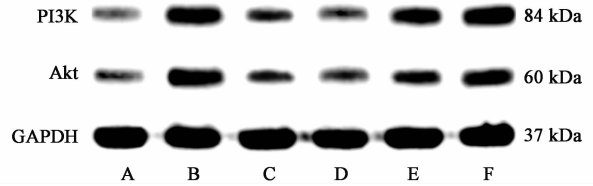


图 1 各组大鼠胃组织 PI3K 及 Akt 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PI3K and Akt protein expression in gastric tissues of rats in each group

母、轻粉等配伍可治疗疮痍已溃, 久不收口者, 正如《神农本草经》所言:“白及味苦, 主痈肿, 败疽, 胃中邪气, 恶疮不收”, 研究表明白及多糖具有降低应激时大鼠的胃黏膜损伤的药理作用, 而其作用机制尚未阐明<sup>[15-16]</sup>。

PI3K/Akt 信号通路是蛋白质合成的重要信号转导通路, 主要由 PI3K 和 Akt 组成, 参与调节细胞的凋亡、增生、迁移、分化以及代谢<sup>[17-19]</sup>, PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 所组成, 且 PI3K 本身具有丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 激酶的活性。一旦 PI3K 被激活, p110 可以使 PIP2 磷酸化转化为 PIP3, 进而与 Akt 的 N 端 PH 结构域结合, 促使 Akt 的活化。Akt 又称 PKB 或 Rac, 在细胞增殖和凋亡中起重要作用。SHEN 等<sup>[20]</sup>研究表明胃溃疡大鼠胃组织 PI3K, Akt mRNA 及蛋白表达升高, 经治疗干预后大鼠 PI3K, Akt mRNA 及蛋白表达下降, 说明 PI3K/AKT 信号传导通路参与胃溃疡大鼠胃黏膜病变, 且通过下调胃黏膜 PI3K, Akt mRNA 及蛋白的表达而达到治疗胃溃疡的作用。又有研究表明 GU 的发生与机体组织内炎症因子分泌水平的紊乱密切相关, 活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞, CD8<sup>+</sup>T 细胞可产生 IL-2, IL-2 可促进活化 B 细胞增殖, 其靶细胞包括 T 细胞, NK 细胞, B 细胞等<sup>[21-22]</sup>, 这些细胞表面均可表达 IL-2 受体 (IL-2R)<sup>[23]</sup>, 而可溶性 IL-2R 是一种免疫抑制因子, 在炎

症反应中具有重要作用<sup>[24]</sup>。IL-4 主要来源于活化的 T 细胞,具有抑制炎症与免疫抑制的功能,在胃肠黏膜微环境稳定中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。

本研究结果显示胃溃疡大鼠血清 NO 含量及胃组织胃蛋白酶活性升高,PI3K/Akt 信号通路被激活,从而促进了炎症因子 IL-2R,IL-4 的表达,这可能为诱发胃溃疡的作用机制之一。经白及多糖干预后,高剂量可明显减小胃溃疡大鼠溃疡面积、降低血清 NO 含量及胃组织胃蛋白酶活性,大鼠胃组织 PI3K,Akt mRNA 及蛋白表达水平均降低,说明白及多糖可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,下调 PI3K 及 Akt mRNA 和蛋白表达,进而抑制炎症因子 IL-2R 及 IL-4 的异常分泌从而抑制细胞的凋亡,减轻炎症反应而发挥保护胃黏膜组织及其功能的作用,这可能是白及多糖治疗胃溃疡的作用机制之一。本研究探讨了白及多糖对胃溃疡的调节效应,为中医药治疗胃溃疡提供客观依据,可为开发治疗胃溃疡的新药提供新的思路。

[参考文献]

[1] 杨庆,陈颖,王娅杰,等. 复方梭子蟹胶囊对大鼠胃溃疡模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(15):160-165.

[2] 司亚龙. 消化性溃疡的进展概述[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(28):62-63.

[3] ARO P, STORSKRUBB T, RONKAINEN J, et al. Peptic ulcer disease in a general adult population: the Kalixanda study: a random population-based study[J]. Am J Epidemiol,2006, 163(11): 1025-1034.

[4] JANG H J, CHOI M H, SHIN W G, et al. Has peptic ulcer disease changed during the past ten years in Korea A prospective multi-center study[J]. Dig Dis Sci,2008, 53(6): 1527-1531.

[5] WONG S N, SOLLANO J D, CHAN M M, et al. Changing trends in peptic ulcer prevalence in a tertiary care setting in the Philippines: a seven-year study[J]. J Gastroenterol Hepatol,2005, 20(4): 628-632.

[6] 花梦,董文秀,孙丽,等. 清热解痉消痞生肌方药抗胃溃疡机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015, 21(8):210-214.

[7] 时松,黄振,罗熠,等. 白芨多糖对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中国药科大学学报,2012,43(6): 535-540.

[8] 马平平,毕珺辉,徐丹,等. 良附丸对 4 种实验性胃溃疡模型大鼠的防治效果[J]. 中医药信息,2018,35(5):9-12.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:95.

[10] 秦亚东,汪荣斌,周宙. 不同产地白及多糖含量测定

[J]. 安徽科技学院学报,2014,28(3):41-44.

[11] 陈黎,朱海涛,杜士明,等. 鄂西北地区白及的多糖含量研究[J]. 中国药师,2014,17(1):62-64.

[12] 于艳,贾天柱,才谦. 茅苍术及其麸炒品对胃溃疡大鼠抗炎作用的比较研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(4):705-710.

[13] 周意,海春霞,贺翠婷,等. 泮托拉唑钠生物黏附性缓释片对胃溃疡大鼠的治疗作用[J]. 中国新药杂志,2018,27(12):1401-1404.

[14] EASTWOOD G L. Is smoking still important in the pathogenesis of peptic ulcer disease [J]. J Clin Gastroenterol, 1997, 25(1): 1-7.

[15] 武桂娟,赵伟丽,赵楠,等. 白芨多糖对大鼠乙酸性胃溃疡治疗作用及机制的探讨[J]. 黑龙江中医药,2012,41(2):50-52.

[16] 武桂娟,刘泓雨,苏晓悦,等. 白芨多糖对大鼠应激性溃疡作用机制的探讨[J]. 中医药学报,2011,39(3): 39-41.

[17] 张亚萍,李卫红,李婧,等. 罂粟饮对子宫内异位症大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(16):24-30.

[18] 尹超,徐俞悦,陈国杨,等. 铁皮石斛复方对“饮食不节”致高血压大鼠的药效及 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的影响[J]. 中国中药杂志,2018,43(11): 2345-2351.

[19] 刘瑞,郑红刚,李卫东,等. 肺瘤平膏及其联合不同类别药物对肺转移微环境中 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 表达的研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(19):3913-3918.

[20] SHEN Y M I, SUN J, NIU C, et al. Mechanistic evaluation of gastroprotective effects of Kangfuxin on ethanol-induced gastric ulcer in mice [J]. Chem Biol Interact, 2017, 273:115-124.

[21] 王建兵,刘二军,张伟玲,等. 电针联合健中愈疡片对实验性胃溃疡模型大鼠  $\beta$ -内啡肽及炎症因子的影响[J]. 东南大学学报:医学版,2018,37(5):925-929.

[22] 孙长庆,李岫琳,赵芹,等. 四联疗法对老年 Hp 阳性胃溃疡患者血清炎症因子及胃消化功能的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(12):2913-2915.

[23] 安海转. 强直性脊柱炎患者外周血 CD4<sup>+</sup>Treg,CD8<sup>+</sup>Treg 细胞水平及低剂量白介素 2 对其作用的研究[D]. 太原:山西医科大学,2018.

[24] NUKUI A, MASUDA A, ABE H, et al. Increased serum level of soluble inter-leukin-2 receptor is associated with a worse response of metastatic clear cell renal cell carcinoma to interferon alpha and sequential VEGF-targeting therapy [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 372.

[25] 贾育新,毕殿勇,成映霞,等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎模型大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-4 及 Caspase-8 基因蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药,2016,27(9):2084-2086.

[责任编辑 周冰冰]