

基于 p62/Keap1/Nrf2 信号通路探讨香砂愈疡汤对胃溃疡大鼠氧化损伤的保护作用

张昊¹, 褚梦慧¹, 王诗琦¹, 李郑生^{2*}, 宋雪莉¹, 石晓如¹, 王玉玲¹

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046;

2. 河南中医药大学李振华学术思想研究所, 郑州 450008)

[摘要] 目的:探讨香砂愈疡汤对乙酸诱导胃溃疡模型大鼠的保护作用并探讨其作用机制,为临床用药提供实验依据。方法:将60只SPF级Wistar大鼠随机分成6组:空白组,模型组,香砂愈疡汤高、中、低剂量组,奥美拉唑组。通过乙酸诱导制作胃溃疡大鼠模型,香砂愈疡汤高、中、低剂量组分别灌胃28,14,7 g·kg⁻¹香砂愈疡汤溶液,奥美拉唑组将奥美拉唑以4.17 g·kg⁻¹溶于生理盐水后灌服,空白组和模型组以等体积生理盐水灌胃,1次/d。连续治疗14 d后处死大鼠,采血并取胃组织,测量并计算胃溃疡面积、胃溃疡抑制率,制作胃黏膜组织病理学切片并观察胃黏膜损伤状态;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中胃黏膜修复因子、胃组织相关蛋白水平、氧化应激因子、炎症因子等指标的变化;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃黏膜组织中p62, Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1),核转录因子E2相关因子2(Nrf2),血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路相关蛋白的表达水平。结果:与正常组比较,模型组胃黏膜出现较为明显的病理变化,白细胞大量浸润;模型组溃疡面积显著增加($P<0.01$),黏蛋白5AC(MUC5AC),表皮生长因子(EGF),超氧化物歧化酶(SOD)和前列腺素E₂(PGE₂)含量显著减少,胃泌素(GAS),8-羟基脱氧鸟苷酸(8-OHdG),丙二醛(MDA),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和环氧合酶-2(COX-2)含量显著增多($P<0.01$),Nrf2,HO-1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),Keap1含量明显增高($P<0.05$),p62蛋白表达降低;与模型组比较,香砂愈疡汤高剂量组和奥美拉唑组细胞层次结构更加清晰,排列规则,形状规整;中、低剂量组对胃黏膜也均有一定的修复作用;香砂愈疡汤高、中剂量组可显著减少乙酸诱导胃溃疡大鼠模型的胃溃疡面积($P<0.01$),提高溃疡抑制率,明显促进胃黏膜组织中MUC5AC和EGF的表达,降低GAS水平($P<0.05$, $P<0.01$),显著降低8-OHdG和MDA水平,提高SOD活性($P<0.01$),显著降低TNF- α 和COX-2表达水平,增加PGE₂的含量,升高胃黏膜组织Nrf2,HO-1蛋白表达($P<0.01$),香砂愈疡汤高剂量组可明显降低Keap1的蛋白表达($P<0.05$),升高p62蛋白表达量。结论:香砂愈疡汤治疗乙酸诱导胃溃疡模型大鼠效果显著,可有效减少溃疡面积,增加溃疡抑制率,保护溃疡组织。其作用机制可能与激活p62/Keap1/Nrf2信号通路,调控相关基因表达,从而改善炎症反应、调控氧化应激反应有关。

[关键词] 胃溃疡; 香砂愈疡汤; 炎症因子; 氧化应激; 核转录因子E2相关因子2(Nrf2); Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

[中图分类号] R2-0;R289;R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0056-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210438

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210105.1551.005.html>

[网络出版日期] 2021-1-6 9:30

Protective Effect of Xiangsha Yuyang Decoction on Oxidative Injury in Rats with Gastric Ulcer Based on p62/Keap1/Nrf2 Signal Pathway

ZHANG Hao¹, CHU Meng-hui¹, WANG Shi-qi¹, LI Zheng-sheng^{2*}, SONG Xue-li¹,
SHI Xiao-ru¹, WANG Yu-ling¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Li Zhenhua Institute of Academic Thought, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[收稿日期] 20201128(010)

[基金项目] 河南省中医药科学研究专项普通课题(2019ZY3049);河南省社发领域科技攻关项目(2018299)

[第一作者] 张昊,在读硕士,从事中医内科肝胆脾胃病研究,E-mail:531541408@qq.com

[通信作者] *李郑生,教授,主任医师,硕士生导师,从事中医内科肝胆脾胃病研究,E-mail:lizhengsheng1958@163.com

[Abstract] **Objective:** To confirm the protective effect of Xiangsha Yuyang decoction on acetic acid-induced gastric ulcer model rats and explore its mechanism, so as to provide experimental basis for clinical drug use. **Method:** The 60 SPF Wistar rats were randomly divided into 6 groups: group, model group, high, middle and low dose groups of Xiangsha Yuyang decoction and omeprazole control group. The rat model of gastric ulcer was induced by acetic acid. The rats in the high, middle and low dose groups of Xiangsha Yuyang decoction were intragastrically administered at the dose of 28, 14, 7 g·kg⁻¹, and with omeprazole at the dose of 4.17 g·kg⁻¹ in normal saline, respectively. The rats in the blank group and model group were intragastrically infused with the same volume of normal saline once a day. After 14 days of continuous treatment, the rats were killed, the blood was collected, the area and inhibition rate of gastric ulcer were measured and calculated, the histopathological sections of gastric mucosa were made and the state of gastric mucosal injury was observed, and the changes of gastric mucosal repair factor, gastric tissue related protein, oxidative stress factor and inflammatory factor in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Detected the expression of p62 Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1 (Keap1), nuclear transcription factor E2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) signal pathway-related proteins in gastric mucosa by Western blot. **Result:** Compared with control group, the gastric mucosa of the model group showed obvious pathological changes and a large number of leukocytes infiltrated. In model group, the ulcer area was significantly increased ($P<0.01$), the contents of mucin mucoprotein 5AC (MUC5AC), epidermal growth factor (EGF), superoxide dismutase (SOD) and increased prostaglandin E₂ (PGE₂) were significantly decreased ($P<0.01$), the gastrin (GAS), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2) were significantly increased. The expression of HO-1 and Nrf2 protein decreased significantly ($P<0.01$), the content of Keap1 increased significantly ($P<0.05$), and the expression of p62 protein decreased. Compared with model group, the hierarchical structure of cells in Xiangsha Yuyang decoction high dose group and omeprazole group were clearer and regular, middle and low dose groups could also repair gastric mucosa to a certain extent. The high and middle dose groups of Xiangsha Yuyang decoction could significantly reduce the gastric ulcer area of acetic acid-induced gastric ulcer rat model ($P<0.01$) and increase the ulcer inhibition rate. It can effectively promote the expression of MUC5AC and EGF in gastric mucosa, decrease the level of GAS ($P<0.05$, $P<0.01$), decrease the level of 8-OHdG and MDA, increase the activity of SOD ($P<0.01$), decrease the expression level of TNF- α and COX-2, increase the content of PGE₂, and significantly increase the amount of Nrf2 and HO-1 protein in gastric mucosa ($P<0.01$). The high dose group of Xiangsha Yuyang decoction could decrease the protein expression of Keap1 ($P<0.05$) and increase the expression of p62 protein. **Conclusion:** Xiangsha Yuyang decoction is effective in the treatment of acetic acid-induced gastric ulcer model rats, which can effectively reduce the ulcer area, increase the ulcer inhibition rate and protect the ulcer tissue. Its mechanism may be related to activating p62/Keap1/Nrf2 signal pathway and regulating the expression of related genes so as to improve inflammatory response and regulate oxidative stress response.

[Key words] gastric ulcer; Xiangsha Yuyang decoction; inflammatory factors; oxidative stress; nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2); Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1 (Keap1); malondialdehyde(MDA); superoxide dismutase (SOD)

胃溃疡(GU)是一种全球性多发消化系统的良性疾病,以穿透肌层,使黏膜组织缺损破裂及炎症浸润为主要的病理改变,该病迁延难愈、反复发作,易导致出血、穿孔、梗阻和癌变等严重并发症^[1-2]。近年来研究表明,许多外部损害因素,如吸烟、过量饮酒、压力、不良饮食和长期摄入非甾体抗炎药

(NSAIDs),是导致GU发病率增高的主要诱因^[3]。现代医学认为,外源性因素引起的胃黏膜损伤和黏膜自我修复效应之间的失衡可直接导致GU的发生^[4]。幽门螺旋杆菌(Hp)感染是诱发GU的重要危险因素^[5],使用H₂受体拮抗剂(H₂RA)及质子泵抑制剂(PPI)短期治疗该病已取得一定疗效,但该病治

愈后仍反复发作的问题始终没有得到根本解决,相关的副作用和治疗后GU的复发引起了越来越多的关注^[6]。因此,寻找一种能较好修复胃黏膜组织且副作用小的理想抗溃疡的药物,是现代医学研究的热点。

中医治疗GU多将其归属在“胃痛”“痞满”“嘈杂”等范畴中,以胃脘部胀满、疼痛、反酸、呕吐等为主要临床表现,多由外邪侵袭、情志刺激、饮食不节等因素所致^[7]。中医药通过多靶点、多角度、多途径治疗GU,已被证实具有疗效显著、副作用小且复发率低等优势^[8]。李郑生教授继承了国医大师李振华的学术思想,提出肝脾胃同治,疏肝健脾和胃的治法治疗GU,临床上已经取得较好疗效。香砂愈疡汤是由李郑生教授结合GU的病因病机及临床表现,在《古今名医方论》香砂六君子汤的基础上化裁而来。本实验在前期临床研究基础上,进一步从分子生物学的角度阐明香砂愈疡汤治疗GU的保护作用和机制,为香砂愈疡汤的临床治疗作用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠60只,体质量180~220 g,购自济南鹏悦实验动物繁育有限公司,合格证号SCXK(鲁)2019-0003。实验动物设施使用许可证号SYXK(豫)2020-0004,该实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准,编号DWL201909303。

1.2 药物与试剂 香砂愈疡汤由麸炒白术10 g(批号200501),茯苓15 g(批号200301),陈皮10 g(批号20200301),姜半夏10 g(批号190920-02),醋香附10 g(批号20200401),砂仁10 g(批号C20050303),姜厚朴10 g(批号20200101),麸炒枳壳10 g(批号20200101),乌药10 g(批号20191101),北刘寄奴10 g(批号191001),浙贝母10 g(批号20190801),炒鸡内金15 g(批号190601),生甘草3 g(批号190101)组成,所有药材均由东济堂中医馆提供;奥美拉唑(北京悦康药业集团有限公司生产,国药准字H20056577);黏蛋白5AC(MUC5AC)试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,批号XY-E10347);8-羟基脱氧鸟苷酸(8-OHdG)试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号EPXS010-12017-901);表皮生长因子(EGF),胃泌素(GAS)试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,批号分别为SEA079Mu,CEB224Ra);丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(沈阳万类生物科技有限公

司,批号分别为WLA048,WL010);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(美国Sigma公司,批号RAB0479-1KT);环氧化酶-2(COX-2)试剂盒(上海恒远生物科技有限公司,批号YS01266B);前列腺素E₂(PGE₂)试剂盒,鼠抗p62多克隆抗体,鼠抗Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)多克隆抗体,鼠抗核转录因子E2相关因子2(Nrf2)多克隆抗体,鼠抗血红素氧合酶-1(HO-1)多克隆抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab133021,ab91526,ab139729,ab132356,ab85309);鼠源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Antibody Revolution公司,批号ARE6011);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠二抗(杭州华安生物技术有限公司,批号HA1006);苏木精染色液(北京Solarbio科技有限公司,批号H8070);曙红Y[生工生物工程(上海)有限公司,批号A600190]。

1.3 仪器 D3024型高速离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司);JT6001型电子天平(上海菁海仪器有限公司);CX23型光学显微镜(日本Olympus公司);Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher公司);164-5050 PowerPac基础型电泳仪电源,1704150全能型蛋白快速转膜仪(美国Bio-Rad公司);GNP-9080BS-III型电热恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);Nano Drop 2000C型微量核酸蛋白测定仪(美国Thermo Scientific公司);LAS-4000 MINI型生物分子成像仪(日本富士公司)。

2 方法

2.1 分组与模型制备 取健康大鼠60只,每组10只,称体质量,大鼠1~60随机编号,运用SPSS 20.0软件进行完全随机化分成6组:空白组,模型组,香砂愈疡汤高、中、低剂量组,奥美拉唑组。各组大鼠适应性饲养7 d后开始造模,造模前禁食不禁水24 h,除空白组外,其余5组均采用外科手术即胃黏膜乙酸注射法制备大鼠GU模型。先用10%水合氯醛腹腔注射麻醉(3.5 mL·kg⁻¹),待完全麻醉,固定大鼠,进行腹壁备皮,常规消毒、铺巾,自剑突沿正中线向下,剪一2 cm左右纵切口,打开腹腔,移出鼠胃。选取胃体与幽门交界部位,用微量注射器向近胃窦处胃黏膜下层注射乙酸0.03 mL,观察胃壁表面注射部位,形成一个圆形不透明区域后,用大网膜覆盖防止药物外漏,将胃体送回腹腔后缝合切口,消毒,术后给予正常饮食(术后当日各组大鼠即可饮水,次日可饮食)。大鼠乙酸注射造模法为制作慢性胃溃疡模型的经典方法^[9],该方法操作稳定

可靠、易重复,造成的溃疡深而大,且自然愈合时间较长,可达60 d左右,愈合后易复发,与临床中病人慢性胃溃疡的病理状态相似。

2.2 给药方法 于大鼠造模后第2天开始,将相应受试药物连续14 d灌胃各对应给药组。参照《药理实验方法学》^[10],空白组和模型组灌服等体积生理盐水;香砂愈疡汤按大鼠与人等效剂量(以60 kg计)换算为高、中、低剂量,分别为28,14,7 g·kg⁻¹,每日1次;奥美拉唑组将药物按4.17 g·kg⁻¹溶于生理盐水后灌胃,每日1次。期间正常喂养标准饲料。

2.3 胃溃疡面积与溃疡指数的测量与计算 大鼠处死后,取出胃体,然后外翻黏膜面从前胃至幽门,蒸馏水冲洗后,寻找溃疡面,分为2部分,一部分用滤纸吸干溃疡面周围水迹,用10倍放大镜观察胃黏膜,拍照并用游标卡尺测量查看到的溃疡组织的最大横径(d_1)和最大纵径(d_2),并记录数据,以计算溃疡面积 S 和胃溃疡抑制率。 $S = \pi \times d_1/2 \times d_2/2$,胃溃疡抑制率 = $(S_{模型} - S_{给药})/S_{模型} \times 100\%$ 。

2.4 胃黏膜病理组织制备与观察 将剩余的鼠胃黏膜进行固定,切取含有溃疡组织约1.2 cm×1.0 cm大小的黏膜组织,迅速浸入4%多聚甲醛中固定24 h,然后按照常规脱水、包埋、切片后,进行苏木素-伊红(HE)染色,在显微镜下观察并记录胃黏膜病理结构变化。

2.5 酶联免疫吸附测定(ELISA)测定血清中各生化指标的含量 治疗14 d后,大鼠禁食不禁水24 h,水合氯醛经腹腔注射麻醉后,固定大鼠,切开皮肤,剖开腹腔,分离肌肉等组织,用一次性真空采血器取大鼠腹主动脉血5 mL放置2 h后,3 000 r·min⁻¹(离心半径8 cm)离心15 min,移取血清置于1.5 mL的离心管中,放于-80 °C冰箱留样保存,根据ELISA试剂盒说明书检测MUC5AC, GAS, EGF, 8-OHdG, MDA, SOD, TNF- α , COX-2及PGE₂的含量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃黏膜组织Nrf2, Keap1, p62及HO-1蛋白的表达 剪取一定量胃黏膜组织,称质量后加入蛋白裂解液,在冰浴条件下机械研磨,研磨后静置、离心(12 000 r·min⁻¹, 15 min),蛋白定量和变性后制得样品,然后依次进行SDS-PAGE电泳、转膜、封闭。之后洗膜,加入Nrf2, Keap1, p62, HO-1, β -actin一抗抗体(稀释倍数均为1:1 000),在4 °C条件下孵育过夜。再次洗膜,加入相应二抗(1:5 000)室温孵育。洗膜,加入ECL发光液,显影、洗片、晾干。采用凝胶图像扫描仪扫描,Image Pro 6.0软件进行蛋白条带灰度分析,以目

标蛋白灰度值与内参蛋白灰度值比值表示蛋白表达水平。

2.7 统计学处理 采用统计学软件SPSS 20.0对数据进行分析,各组数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的数据,采用单因素方差分析进行组间比较,方差齐者用最小显著性差异法(LSD)进行两两比较,若方差不齐,则采用Tamhane法两两比较;不符合正态分布采用非参数检验进行分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对GU大鼠溃疡面积及胃溃疡抑制率的影响与空白组比较,模型组溃疡面积显著增大($P < 0.01$);与模型组比较,香砂愈疡汤高、中剂量组和奥美拉唑组大鼠胃溃疡面积显著缩小($P < 0.01$)。见表1。

表1 香砂愈疡汤对GU大鼠溃疡面积及胃溃疡抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

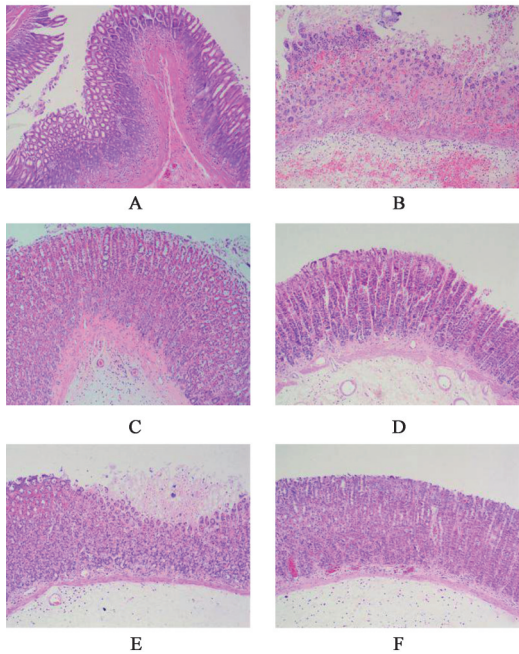
Table 1 Effect of Xiangsha Yuyang decoction on ulcer area and gastric ulcer inhibition rate in GU rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	溃疡面积/mm ²	胃溃疡抑制率/%
空白		0	0
模型		8.47±1.47 ²⁾	0
香砂愈疡汤	28	4.78±0.75 ⁴⁾	42.47±0.11
	14	6.13±1.15 ⁴⁾	29.60±0.17
	7	6.68±1.79	26.07±0.09
奥美拉唑	4.17	3.42±0.54 ⁴⁾	58.19±0.11

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2~5同)。

3.2 对GU大鼠胃黏膜组织病理学变化的影响 空白组大鼠胃黏膜结构正常,基底层细胞紧密规整,组织细胞形态正常,未见炎性浸润以及水肿、增生等明显的病理特征;模型组大鼠胃黏膜结构明显损伤,溃疡正处于活动期,黏膜细胞水肿明显,溃疡可达黏膜层,表明造模成功。与模型组比较,各治疗组黏膜组织损伤明显减轻,并且均能吸收一定程度炎性坏死组织,减轻水肿,减轻细胞排列紊乱;奥美拉唑组与香砂愈疡汤高剂量组相似,溃疡得到极大程度的修复,组织细胞连接完整,炎性浸润明显减少,组织增生活跃;香砂愈疡汤中剂量组使黏膜有很大程度的修复,炎性细胞浸润黏膜表层,基层细胞结构完整;香砂愈疡汤低剂量组黏膜表层炎性浸润、水肿明显,但基层细胞排列紊乱减轻。见图1。

3.3 对GU大鼠MUC5AC, EGF和GAS含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠分泌的MUC5AC, EGF含量显著降低, GAS含量显著升高($P < 0.01$);



A. 空白组; B. 模型组; C. 香砂愈疡汤高剂量; D. 香砂愈疡汤中剂量组; E. 香砂愈疡汤低剂量组; F. 奥美拉唑组

图1 香砂愈疡汤对GU大鼠胃黏膜组织病理变化的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Xiangsha Yuyang decoction on pathological changes of gastric tissue in GU rats (HE, ×200)

与模型组比较, 香砂愈疡汤高、中剂量组胃组织MUC5AC, EGF含量显著升高($P < 0.01$), GAS水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表2。

3.4 对GU大鼠血清氧化应激因子的影响 与空白

表2 香砂愈疡汤对GU大鼠MUC5AC, EGF及GAS含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Xiangsha Yuyang decoction on MUC5AC, EGF and GAS in GU rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MUC5AC/μg·L ⁻¹	EGF/ng·L ⁻¹	GAS/ng·L ⁻¹
空白		57.62±9.83	106.12±22.08	17.28±4.43
模型		26.93±6.88 ²⁾	31.57±8.66 ²⁾	36.71±8.89 ²⁾
香砂愈疡汤	28	46.71±8.51 ⁴⁾	67.41±15.46 ⁴⁾	21.47±4.60 ⁴⁾
	14	41.08±11.01 ⁴⁾	53.90±10.21 ⁴⁾	23.80±6.25 ³⁾
	7	31.43±8.79	36.06±6.78	29.92±6.40
奥美拉唑	4.17	50.89±10.32 ⁴⁾	84.04±23.27 ⁴⁾	19.88±4.03 ⁴⁾

表3 香砂愈疡汤对实验性大鼠8-OHdG, MDA及SOD含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Xiangsha Yuyang decoction on 8-OHdG, MDA and SOD in experimental rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	8-OHdG/μg·L ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹
空白		5.10±1.02	1.99±0.53	12.17±2.73
模型		19.20±4.83 ²⁾	8.43±1.48 ²⁾	3.14±0.93 ²⁾
香砂愈疡汤	28	8.63±2.14 ⁴⁾	4.04±0.85 ⁴⁾	9.17±2.60 ⁴⁾
	14	9.25±1.89 ⁴⁾	5.27±1.09 ⁴⁾	8.28±2.25 ⁴⁾
	7	13.41±2.35 ⁴⁾	6.20±0.92 ³⁾	6.14±1.18 ⁴⁾
奥美拉唑	4.17	7.20±1.54 ⁴⁾	3.35±0.73 ⁴⁾	10.26±2.01 ⁴⁾

组比较, 模型组的血清中8-OHdG和MDA的含量显著升高, SOD水平显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 奥美拉唑组及香砂愈疡汤高、中剂量组大鼠血清中的8-OHdG和MDA水平显著降低($P < 0.01$), 奥美拉唑组及香砂愈疡汤高、中、低剂量组大鼠血清中的SOD水平显著升高($P < 0.01$)。见表3。

3.5 对GU大鼠血清炎症因子的影响 与空白组比较, 模型组大鼠血清中TNF-α和COX-2的含量均显著升高($P < 0.01$), PGE₂含量显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 奥美拉唑组及香砂愈疡汤高、中剂量组TNF-α和COX-2的含量均显著降低($P < 0.01$), PGE₂的水平显著升高($P < 0.01$)。见表4。

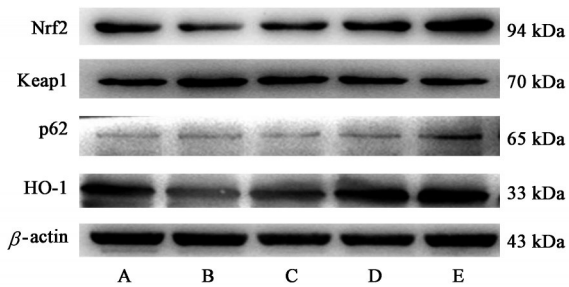
3.6 对GU大鼠胃黏膜组织Nrf2, Keap1, p62及HO-1蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组胃黏膜组织Nrf2, HO-1蛋白表达显著降低($P < 0.01$), Keap1蛋白表达明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 香砂愈疡汤高、中剂量组可以明显升高Nrf2, HO-1表达量, 降低Keap1的表达量($P < 0.05, P < 0.01$), 香砂愈疡汤高剂量组可以明显升高p62蛋白表达($P < 0.05$)。见图2, 表5。

4 讨论

GU是在各种致病因子共同作用下, 导致黏膜肌层局限性组织缺损坏死、炎症反应为主要病理改变的广泛多发性消化系统疾病^[2]。李郑生教授认为GU病在肠胃, 但与肝、脾、胃三脏密切相关, 发病多

表 4 香砂愈疡汤对 GU 大鼠 TNF- α , COX-2 及 PGE₂ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	COX-2	PGE ₂
空白		4.63±0.96	8.56±2.15	15.29±2.17
模型		11.76±2.48 ²⁾	20.57±4.47 ²⁾	4.62±0.96 ²⁾
香砂愈疡汤	28	5.65±1.21 ⁴⁾	10.25±3.65 ⁴⁾	12.44±1.67 ⁴⁾
	14	6.02±0.88 ⁴⁾	13.57±2.87 ⁴⁾	10.34±2.62 ⁴⁾
	7	9.83±1.08	18.68±2.05	5.02±0.83
奥美拉唑	4.17	4.92±1.02 ⁴⁾	9.83±3.55 ⁴⁾	13.44±1.89 ⁴⁾



A. 空白组; B. 模型组; C. 香砂愈疡汤低剂量组; D. 香砂愈疡汤中剂量组; E. 香砂愈疡汤高剂量组

图 2 大鼠胃黏膜组织中 Nrf2, Keap1, p62 及 HO-1 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoretic of Nrf2, Keap1, p62 and HO-1 proteins expression in gastric mucosa of rats

有饮食不节、情志不舒等因素^[11-12],其自拟方香砂愈疡汤以白术、香附共为君药,起到健脾益气、疏肝和胃的功效;以茯苓、陈皮、砂仁、姜半夏为臣药,起到渗湿健脾、理气化痰、温中行气、降逆和胃的功效,助君药行健脾疏肝和胃之效;炒枳壳、厚朴共奏行滞消胀、下气除满之效,乌药、浙贝母、北刘寄奴发挥行气止痛、清热散结、活血化瘀之功,鸡内金健胃消食,共为佐药;以生甘草为使药,调和诸药,同时助白术补气健脾。本方协调肝、脾、胃,补中寓行,以健脾、疏肝、和胃为主。课题组前期通过香砂愈疡汤治疗消化性溃疡患者临床观察,对胃痛、反酸、烧心、嘈杂等临床症状,以及镜下溃疡面修复和 Hp 感染情况,进行治疗前和治疗后临床分析,总有效率为 96.56%。这为进一步探讨香砂愈疡汤治疗 GU

在修复溃疡和减少损伤机制方面提供了扎实临床和经验基础。本研究建立乙酸型胃溃疡大鼠模型,以香砂愈疡汤高、中、低剂量组实行药物干预,观察不同剂量组大鼠胃黏膜组织切片形态,测量并计算各组大鼠胃溃疡面积、溃疡抑制率,以及测量血清中相关保护因子、氧化应激因子以及炎症因子等指标的含量变化,初步证实香砂愈疡汤对胃溃疡组织的保护作用并探讨其作用机制。

本研究显示,香砂愈疡汤干预下可明显减小溃疡组织面积,增加溃疡抑制率;HE 染色结果显示,香砂愈疡汤可减轻炎症水肿,促进细胞增生,减轻胃溃疡黏膜损伤。MUC5AC 是一种保护胃黏膜的分泌型糖蛋白,可以作为胃黏膜的保护屏障^[13]。GAS 是胃肠分泌的一种激素,可刺激胃窦黏膜分泌胃酸,通过促进细胞因子和炎症介质的表达和释放,参与胃黏膜炎症的功能^[14]。过量 GAS 导致上消化道黏膜血流量增加,胃酸含量升高以及激活胃蛋白酶活性等作用,从而增加对胃黏膜的炎症反应,引起氧化应激反应,导致溃疡^[15]。另外,EGF 是一种影响细胞分裂或分化的分泌因子,对细胞的增殖、分化和代谢有重要的调控作用^[16]。EGF 水平的增加可有效改善胃黏膜血液循环、保护胃黏膜免受损伤,同时还可以抑制胃酸、胃蛋白的分泌,是促进溃疡愈合的重要调节因子^[17-18]。炎症反应是导致胃溃疡的重要原因之一,在胃黏膜溃疡病灶处,单核巨噬细胞产生的促炎症性细胞因子 TNF- α ^[19],可诱

表 5 香砂愈疡汤对 GU 大鼠胃黏膜组织中 Nrf2, Keap1, p62 及 HO-1 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nrf2/ β -actin	Keap1/ β -actin	p62/ β -actin	HO-1/ β -actin
空白		1.00±0.13	1.00±0.08	1.00±0.03	1.00±0.04
模型		0.51±0.02 ²⁾	1.36±0.11 ¹⁾	0.98±0.04	0.42±0.02 ²⁾
香砂愈疡汤	28	1.12±0.08 ⁴⁾	1.02±0.05 ³⁾	1.22±0.03 ³⁾	1.12±0.83 ⁴⁾
	14	1.02±0.06 ⁴⁾	1.01±0.06 ³⁾	0.99±0.05	1.01±2.62 ⁴⁾
	7	0.68±0.08	1.11±0.03	1.01±0.03	0.56±1.67

导 COX-2 的表达,加剧氧化应激反应,同时下调 MUC5AC 和 PGE₂ 的表达,增加 GAS 的含量。COX-2 是一种诱导型环氧化酶,是炎症发生过程中的重要因子,当机体细胞受到炎症因子刺激时迅速合成,同时催化花生四烯酸产生的 PGE₂^[20]。而 PGE₂ 可抑制肥大细胞分泌炎症介质,减轻炎症反应,同时刺激黏液和 HCO₃⁻ 的分泌,增加黏膜血流和促进上皮再生等作用^[21]。氧化应激反应是指体内活性氧物质堆积,破坏抗氧化防御系统,从而损伤组织细胞的过程^[22]。8-OHdG 是一种氧化性加合物,由活性氧自由基攻击 DNA 分子中的鸟嘌呤碱基第 8 碳原子而生成,MDA 是氧自由基作用于细胞膜脂和活性氧化的产物,SOD 是细胞内生的天然的自由基清除因子,可以清除体内代谢产生的氧自由基,三者的含量可以反应体内氧化损伤和修复的程度^[23-24]。本实验研究显示,香砂愈疡汤高剂量组可有效抑制炎症因子 TNF- α , COX-2 的异常释放,减少胃内 GAS 的含量,上调 MUC5AC, EGF 和 PGE₂ 的表达,从而减少炎症反应,促进溃疡愈合。同时,在外界刺激下胃黏膜可产生氧化应激反应,导致氧化因子 8-OHdG, MDA 与抗氧化因子 SOD 之间失衡,从而破坏黏膜组织,导致溃疡。实验结果显示,香砂愈疡汤高剂量组可明显下调 8-OHdG, MDA 表达水平,增加 SOD 水平,有效调节机体氧化活性因子与抗氧化因子之间的平衡。

p62/Keap1/Nrf2 介导的信号通路是机体内维持氧化应激、氧化还原平衡的重要信号通路^[25]。Nrf2 是调节氧化应激反应过程中重要的转录因子,在正常生理状态下,Keap1 和 Nrf2 结合成复合物,以抑制状态存在于细胞质中,同时结合 E3 泛素连接酶 (Cul3),使 Nrf2 不断被蛋白酶体泛素化降解,使机体内的 Nrf2 含量处于一个较低水平^[26]。当机体处于氧化应激状态下,Keap1 的半胱氨酸残基构象改变,使结合的 Nrf2 解离,并进入细胞核与 ARE 结合,调控下游抗氧化蛋白和解毒酶的表达,转录出 HO-1, 编码还原型辅酶 1 (NQO1) 等,进而降低氧化应激对细胞和组织的损伤^[27-28]。p62 是一种含有 7 个功能结构域的应激蛋白,是 Keap1/Nrf2 通路上游重要的调控因子。在应激状态下,p62 蛋白表达上调,同时阻断 Keap1 与 Nrf2 的结合,竞争性结合 Keap1,抑制 Nrf2 泛素化,从而激发下游基因表达^[29]。本研究显示,香砂愈疡汤高剂量组可显著上调 p62 蛋白含量,抑制 Nrf2 蛋白降解,降低 Keap1 蛋白表达,促进下游 HO-1 蛋白的转录,从而发挥抗氧化应激的

效果。

综上所述,香砂愈疡汤干预乙酸诱导 GU 大鼠模型,对大鼠胃黏膜组织具有明显的修复和保护作用。其作用机制可能是调控 p62/Keap1/Nrf2 信号通路,减轻炎症反应,调节氧化应激反应的平衡有关。香砂愈疡汤作为中药复方,本身成分复杂,具有多靶点,双向调节等多种作用。此外,GU 的致病机制复杂,中医药治疗 GU 的机制研究尚处于初级阶段,以转录组学,蛋白组学以及代谢组学等多组学技术为研究手段,进一步探索其作用机制是未来的研究方向。

[参考文献]

- [1] SILVA D M D, MARTINS J L R, OLIVERIRA D R D, et al. Effect of allantoin on experimentally induced gastric ulcers: pathways of gastroprotection [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 821: 68-78.
- [2] 张声生,王垂杰,李玉锋,等. 消化性溃疡中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 4089-4093.
- [3] SHEN Y, 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.
- [4] ZHANG K, LIU Y, WANG C, et al. Evaluation of the gastroprotective effects of 20 (S)-ginsenoside Rg₃ on gastric ulcer models in mice [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(4): 550-561.
- [5] FERREIRA V R M D, FERREIRA V I D, ADENIELSON V E S, et al. Helicobacter pylori infection and immune profile of patients with different gastroduodenal diseases [J]. *Arq Gastroenterol*, 2018, 55(2): 122-127.
- [6] 虎喜成,田文荣,刘敬霞,等. 中医药治疗胃溃疡的临床研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(1): 208-210.
- [7] 王开英,陈柯婷,毛炜,等. 胃溃疡验方剂联合奥美拉唑治疗胃溃疡的疗效及对胃肠激素水平影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(10): 2526-2528.
- [8] 姚晓艳,刘文,宋信莉,等. 左金对乙醇诱导致大鼠胃溃疡的治疗作用及机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(10): 2404-2407, 2565.
- [9] OKABE S, AMAGASE K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(8): 1321-1341.
- [10] 徐叔云,卞如镰,陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版.

- 北京:人民卫生出版社,2002:1333-1334.
- [11] 李郑生,黄清. 李振华教授治疗消化性溃疡经验[J]. 中医研究,2007,20(5):51-53.
- [12] 宋雪莉,石晓如,张昊,等. 李郑生教授运用脾胃肝动态辨证方法治疗消化性溃疡经验[J]. 中医研究,2019,32(8):34-35.
- [13] TAMURA M, TANAKA T, FUJII N, et al. Potential interaction between Galectin-2 and MUC5AC in mouse gastric mucus[J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(2):356-360.
- [14] PETRY F S, DORNELLES A S, LICHTENFELS M, et al. Histone deacetylase inhibition prevents the impairing effects of hippocampal gastrin-releasing peptide receptor antagonism on memory consolidation and extinction[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 307:46-53.
- [15] 张雪,惠灿灿,孙建然,等. 胃泌素-17的临床研究进展[J]. 中国医药科学,2018,8(18):19-23,27.
- [16] DONOHOE F, WIKINSON M, BAXTER E, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and obesity-related cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4):1241.
- [17] KIM H, KONG W H, SEONG K Y, et al. Hyaluronate-epidermal growth factor conjugate for skin wound healing and regeneration [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(11):3694-3705.
- [18] 秦华珍,李明芳,丘海冰,等. 红豆蔻、大高良姜乙酸乙酯部位对胃溃疡寒证大鼠胃组织 GAS、MOT、EGF、VEGF、6-keto-PGF 1α 的影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(9):3886-3889.
- [19] 张丽芹,丁锋. 茵陈蒿汤加味配合桑苧胶囊治疗肺胃湿热型痤疮的疗效及对血清 TNF- α 、IL-8 和相关性激素水平的影响[J]. 四川中医,2018,36(4):149-153.
- [20] 陈美霓,郭浩,郭巍,等. COX-2 蛋白和 VEGF-C 蛋白在胃癌和非胃癌黏膜病变组织中的表达及临床意义[J]. 海南医学,2015,26(18):2671-2674.
- [21] JI W, LIANG K, AN R, et al. Baicalin protects against ethanol-induced chronic gastritis in rats by inhibiting Akt/NF- κ B pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 239:117064.
- [22] SHIN D, MOON H W, OH Y, et al. Defensive properties of ginsenoside Re against UV-B-induced oxidative stress through up-regulating glutathione and superoxide dismutase in HaCaT keratinocytes[J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(1):249-260.
- [23] 胡昌军,张志军,姚祖福,等. 茯苓多糖抑制甲醛染毒小鼠 DPC 和 8-OHdG 的实验研究[J]. 毒理学杂志,2020,34(5):413-415.
- [24] MOUSA A M, EL-SAMMAD N M, HASSAN S K, et al. Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1):18-27.
- [26] STEPKOWSKI T M, KRUSZEWSKI M. Molecular cross-talk between the Nrf2/Keap1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(9):1186-1195.
- [27] SUZUKI T, YAMAMOTO M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(41):16817-16824.
- [28] CANNING P, SORRELL F J, BULLOCK A N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88:101-107.
- [29] SUZUKI T, YAMAMOTO M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88:93-100.
- [30] SUN X, QU Z, CHEN R, et al. Activation of the p62-Keap1-Nrf2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2015, 63(1):173-184.

[责任编辑 孙丛丛]