

高良姜黄酮组合物抑制PI3K/Akt通路对幽门螺杆菌 胃炎小鼠的保护作用

罗鑫¹, 郑吴殷晓¹, 杨敬宇¹, 詹健婷¹, 马浩然¹, 叶晓川¹, 干国平², 刘丹^{1*}

(1. 湖北中医药大学药学院中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 武汉 430065;

2. 湖北省中药炮制工程技术研究中心, 武汉 430065)

[摘要] 目的:探讨高良姜黄酮组合物对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)胃炎小鼠的保护作用及其机制。方法:健康SPF级C57BL/6J小鼠56只适应喂养1周后,所有小鼠灌胃混合抗生素,连续3 d。按照体质量随机分为正常组,模型组,阳性药组(三联治疗组),高良姜黄酮组合物低、高剂量组(100、200 mg·kg⁻¹)。除正常组外各组通过灌胃*H. pylori*悬液建立*H. pylori*胃炎小鼠模型。造模成功后灌胃给药,每天1次,连续给药2周。苏木素-伊红(HE)染色观察胃组织病理学变化;快速尿素酶试纸检测*H. pylori*阳性率;采用银染色观察胃组织表面*H. pylori*附着情况;免疫组化法检测胃组织白细胞介素(IL)-8、髓样分化因子88(MyD88)蛋白的表达情况;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测胃组织中IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-8和IL-1 β 的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠胃重系数降低、胃液pH升高、*H. pylori*感染率为100%,胃组织病理学显著改变。模型组小鼠胃组织中的IL-8、MyD88蛋白表达显著升高,小鼠血清中炎症因子水平IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 均显著上调($P<0.01$)。与模型组比较,高良姜黄酮组合物各治疗组小鼠胃重系数显著升高($P<0.01$),胃液pH显著降低($P<0.01$),*H. pylori*感染率显著降低,小鼠胃组织中的IL-8和MyD88蛋白表达显著降低($P<0.01$),血清中IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 炎症因子水平均显著降低($P<0.01$),呈现剂量依赖性。高良姜黄酮组合物下调*H. pylori*胃炎细胞中PI3K和Akt蛋白的表达($P<0.01$)。结论:高良姜黄酮组合物对*H. pylori*胃炎具有一定的保护作用,其机制与降低*H. pylori*感染率、调控PI3K/Akt相关信号通路抑制炎症因子释放相关。

[关键词] 幽门螺杆菌;幽门螺杆菌胃炎;高良姜;黄酮组合物;炎症因子

[中图分类号] R259;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)08-0061-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20250203

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250114.1405.001>

[网络出版日期] 2025-01-14 14:31:42

Protective Effect against *Helicobacter pylori* Gastritis in Mice by Flavonoid Combinations of Alpiniae Officinarum Rhizoma via Inhibition of PI3K/Akt Pathway

LUO Xin¹, ZHENG Wuyinxiao¹, YANG Jingyu¹, ZHAN Jianting¹, MA Haoran¹,

YE Xiaochuan¹, GAN Guopin², LIU Dan^{1*}

(1. Hubei Key Laboratory of Resource and Chemistry of Chinese Medicine, School of Pharmacy,
Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Engineering Research
Center for Traditional Chinese Medicine Processing, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of action of flavonoid combination of *Alpiniae Officinarum Rhizoma* (*A. officinarum*) against *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) gastritis in mice. **Methods:** After acclimatization for one week, 56 SPF-grade healthy C57BL/6J mice were gavaged with mixed antibiotics for three consecutive days. They were randomly divided into a normal group, model group, positive drug group (triple therapy group), and low- and high-dose groups (100, 200 mg·kg⁻¹) of flavonoid combination of *A. officinarum*. The *H. pylori* gastritis mice model was established by gavage with

[收稿日期] 2024-10-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82173960,31400302)

[第一作者] 罗鑫,在读硕士,从事中药物质基础及作用机制研究,E-mail:593994718@qq.com

[通信作者] *刘丹,博士生导师,副研究员,从事中药药效物质基础及质量评价,E-mail:ztt661@hbucom.edu.cn

H. pylori bacterial suspension in each group except for the normal group. After successful modeling, mice were administrated with corresponding drugs once a day for two weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in gastric tissue. Rapid urease test paper was used to detect the positive rate of *H. pylori*. Silver staining was used to observe the *H. pylori* adherence on the surface of gastric tissue. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of interleukin-8 (IL)-8 and myeloid differentiation factor (MyD88) in gastric tissue. The serum levels of IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-8, and IL-1 β were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) protein were detected by Western blot. **Results:** Compared with those in the normal group, mice in the model group had lower gastric weight coefficients, higher pH of gastric juice, 100% *H. pylori* infection rate, and significantly changed gastric histopathology. The expressions of IL-8 and MyD88 proteins in the gastric tissue of mice in the model group were significantly elevated, and the serum levels of inflammatory factors IL-6, TNF- α , IL-8, and IL-1 β were significantly up-regulated in mice. Compared with that in the model group, the gastric weight coefficient of mice in each treatment group of the flavonoid combinations of *A. officinarum* was elevated ($P<0.01$), and the pH of gastric juice was reduced ($P<0.01$). The infection rate of *H. pylori* was reduced. The expressions of IL-8 and MyD88 proteins in the gastric tissue of mice in the treatment groups were significantly reduced ($P<0.01$), and the serum levels of inflammatory factors IL-6, TNF- α , IL-8, and IL-1 β were significantly reduced in a dose-dependent manner ($P<0.01$). The flavonoid combinations of *A. officinarum* down-regulated the expression of PI3K and Akt proteins in *H. pylori* gastritis-infected cells ($P<0.01$). **Conclusion:** The protective effect of flavonoid combinations of *A. officinarum* against *H. pylori* gastritis is associated with the inhibition of *H. pylori* infection rate and regulation of PI3K/Akt signaling pathway, resulting in inhibiting the release of inflammatory factors.

[Keywords] *Helicobacter pylori*; *H. pylori* gastritis; *Alpiniae Officinarum* Rhizoma ; flavonoid combination; inflammatory factor

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)是一种螺旋形或者短杆状的革兰阴性微需氧菌,被世界卫生组织定义为 I 类致癌物^[1-2]。*H. pylori*胃炎是一类与*H. pylori*感染相关的慢性活动性胃炎,与胃溃疡,胃癌的发生密切相关^[3]。根除*H. pylori*能显著改善*H. pylori*胃炎患者的胃黏膜炎症,延缓或阻止胃黏膜萎缩,显著降低胃癌发生的风险^[4]。临床上,通常采用含铋剂的四联疗法根除*H. pylori*,即铋剂和质子泵抑制剂,外加2种抗生素,常用的抗生素主要有阿莫西林、克拉霉素和甲硝唑等^[5-6]。然而近年来,随着抗生素耐药日益严峻,*H. pylori*根除率逐渐下降^[7-8]。实践证明,中医药治疗*H. pylori*胃炎具有复发率低,不良反应小的特色与优势,因此,从中药中开发新的*H. pylori*胃炎治疗药物是一条新途径^[9-10]。

高良姜是姜科植物高良姜的干燥根茎,具有“温胃止呕,散寒止痛”的功效,常见于治疗胃部疾病的方剂中,例如良附丸^[11]。已有研究表明,高良姜提取物具有抑菌作用^[12-13],且高良姜总黄酮组分对胃溃疡具有良好的保护作用^[14]。课题组前期研究发现高良姜乙酸乙酯部位是高良姜抗*H. pylori*胃炎主要活性部位^[15-16],进一步采用“敲除策略”结合体外*H. pylori*胃炎细胞模型辨识高良姜黄酮组合物(FLA)是其治疗*H. pylori*胃炎的关键活性组分^[17],然而FLA体内抗*H. pylori*胃炎活性及其机制尚不明确。因此,本研究通过构建*H. pylori*胃炎小鼠体内体外模型,对FLA进行药效学验证,并基于PI3K/Akt通路探讨其治疗*H. pylori*胃炎的作用

机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 56 只(动物质量合格证号 410983231100300625),体质量 18~20 g,由河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供,合格证号 SCXK(豫)2020-0005,实验动物符合湖北中医药大学伦理委员会规定。饲养于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级环境,饲养条件为温度 23~25℃,湿度为 45%~55%,明暗循环各 12 h,正式实验前适应性饲养 1 周,期间自由饮水和摄食,动物实验获得了湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理号 HUCMS07061447)。

1.2 *H. pylori* *H. pylori* 标准菌株 ATCC43504(宁波明舟生物科技有限公司,货号 B84182)。

1.3 细胞 人胃黏膜上皮细胞(GES-1,北纳创联生物科技有限公司,批号 220729),取 10~20 代之间进行细胞实验。

1.4 试药 FLA(主要含有短叶松素、松属素、高良姜素、高良姜素-3-甲醚和山柰素)由实验室自制,经高效液相色谱法(HPLC)含量测定,5 个单体黄酮类成分的含量占 FLA 的 85.94%。

1.5 试剂 无水乙醇、二甲苯、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,货号分别为 100092683、10023418、10004160);苏木素-伊红(HE)染液套装、Warthin-Starry 染色试剂盒(武汉皮诺飞生物科技有限公司,批号分别为 20231225002、S191077);心浸液肉汤(BHI)培养基、脱纤维羊血、维生素 K₁、氯化

血红(青岛海博生物技术有限公司,货号分别为HB8478、1001339-1、HB0310b、HB0310a);琼脂(德国默克公司,货号A1296);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,货号11011-8611);硫酸庆大霉素、氨苄青霉素(赛国生物科技有限责任公司,批号分别为EZ650D92AC、EZ6491D928);阿奇霉素(上海源叶生物有限公司,批号M20H5178594);奥美拉唑(湖南方盛制药股份有限公司,批号230507);阿莫西林(联邦制药国际控股有限公司,批号37050205);克拉霉素(杭州中美华东制药有限公司,批号2304406);4%多聚甲醛、胰酶(北京兰杰柯科技有限公司,批号23319084、01100017);白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海抚生实业有限公司,批号均为202401、);洛斯维公园纪念研究所培养基(RPMI-1640)、胎牛血清(FBS)(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号分别为WH0023Z041、SA220629);磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、p-磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、PI3K、Akt抗体(英国Affinity公司,批号分别为#AF0016、#AF3241、#AF6241、#AF0836);抗兔免疫球蛋白(Ig)G、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为#7074、#5174)。

1.6 仪器 MJPS-150型培养箱(上海精宏实验设备有限公司);ANOXOMAT MARK II型厌氧微需氧培养系统(荷兰Anoxomat Mark公司);SPARK 10M型酶标仪(美国Tecan公司);NIKON ECLIPSE T1-SR型倒置显微镜(日本尼康公司);PowerPac型电泳仪、转膜仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 参照文献制作 *H. pylori* 胃炎小鼠模型^[18]。健康 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 56 只适应喂养 1 周后,所有小鼠灌胃混合抗生素生理盐水混悬液(氨苄青霉素 10 g·L⁻¹、庆大霉素 1.2 g·L⁻¹、阿奇霉素 10 g·L⁻¹)0.3 mL 每只,1 次/d,连续 3 d。正常喂养 7 d 后,按照体质量随机分为正常组、模型组、阳性药组,FLA 低、高剂量组,正常组和模型组小鼠每组 13 只,其余每组 10 只。除正常组外,其余组小鼠灌胃 1×10⁹ CFU·mL⁻¹ 新鲜的 *H. pylori* 菌悬液,0.3 mL 每只,隔天 1 次,共 7 d,正常组灌胃等量无菌的空白溶液,定植 4 周后,分别从正常组和模型组取 3 只,检测造模是否成功,造模成功后灌胃给药。阳性药组采用三联疗法(奥美拉唑 2.6 mg·kg⁻¹、阿莫西林 13 mg·kg⁻¹、克拉霉素 6.5 mg·kg⁻¹),剂量根据文献

确定^[19];FLA 的剂量根据课题组前期实验结果和文献制定^[20],低剂量为 100 mg·kg⁻¹,高剂量为 200 mg·kg⁻¹。所有药物采用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)混悬,每天 1 次,每次 0.2 mL 的灌胃体积,连续灌胃 14 d,正常组和模型组灌胃等量的空白溶剂。

2.2 胃重系数和胃液 pH 测定 末次给药后小鼠禁食不禁水 12 h,采用乙醚吸入麻醉,摘眼球取血前用电子秤称量每只小鼠的体质量。眼球取血后,将小鼠解剖,结扎幽门,取出胃,用 1.5 mL 离心管从贲门处收集胃液,用精密 pH 试纸测定胃液 pH。将胃沿着胃大弯剪开,用生理盐水冲洗干净,滤纸吸干,于电子天平称量胃组织质量,计算胃重系数。

2.3 快速尿素酶实验 在胃组织幽门至胃窦范围处剪下一小块胃黏膜组织于 *H. pylori* 快速尿素酶试纸上,按照说明书进行操作,试纸在 1 min 内变红,则为强阳性,在 3 min 内变红则为弱阳性,不变色即为阴性。

2.4 HE 染色观察胃组织病理变化 取多聚甲醛固定的胃组织,经脱水,石蜡包埋和组织切片后,进行 HE 染色。光学显微镜下观察胃组织结构并拍照。

2.5 Warthin-Starry 银染色观察胃组织病理变化 取 4% 多聚甲醛固定的胃组织,经脱水,石蜡包埋和组织切片后,进行 Warthin-Starry 染色。光学显微镜下对着染棕色的部位观察并拍照。

2.6 免疫组化检测小鼠胃组织 IL-8 和 MyD88 的表达 将小鼠胃组织石蜡块进行切片,切片脱蜡后进行抗原修复,4℃条件下孵育 IL-8(1:100)、MyD88(1:100)一抗过夜,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,将切片与对应属种的 CY3 标记的免疫球蛋白(Ig)G(1:300)在室温下孵育 1 h。显色并用苏木素复染细胞核,梯度乙醇脱水并封片。最后置于镜检,细胞核呈蓝色,相应炎症因子阳性表达呈棕黄色,Image J 软件用于定量分析。

2.7 ELISA 检测小鼠血清 IL-6、TNF- α 、IL-8 和 IL-1 β 含量 乙醚麻醉,眼球取血后的血液室温静置 8 h,3 000 r·min⁻¹(离心半径 19 cm,下同),30 min 离心取血清,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测小鼠血清炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-8 和 IL-1 β 水平。

2.8 *H. pylori* 胃炎细胞模型的构建及给药 将对数期的 GES-1 细胞接种在 12 孔板,每孔 1×10⁵ 个细胞。待细胞贴壁后,除空白组外,每孔加入浓度为 1×10⁷ CFU·mL⁻¹ 的 *H. pylori* 悬液,使细菌与细胞数量比为 100 CFU:1 个,采用同时给药的方式加入药

液,FLA的给药质量浓度设置为4、8、16 mg·L⁻¹该剂量根据课题组前期工作基础和预实验结果确定,空白组和模型组加入等量的培养基^[17]。给药后将12孔板放入培养箱继续培养24 h。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PI3K/Akt信号通路蛋白表达 培养结束后,弃去培养基,用PBS清洗细胞2次,加入的新鲜配制含蛋白酶抑制剂和磷酸抑制剂的RIPA裂解液150 μL,冰上裂解15 min,用刮刀刮下裂解物并转移到1.5 mL的离心管中,4℃条件下12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清200 μL并加入5×的蛋白上样缓冲液50 μL,混匀后100℃条件下水浴加热8 min,分装后保存于-20℃条件下备用。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质样品(每组50 μg),然后转移到0.45 μm孔径PVDF膜上。使用快速封闭液封闭30分钟,并与下列特异性一抗PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt、p-Akt、GAPDH(1:1 000),GAPDH(1:5 000)孵育过夜。膜与相应的二抗(1:2 000)相互作用1.5 h GAPDH用作内参。采用ECL法检测蛋白条带,并通过凝胶成像系统扫描、采集图像,Image J软件用于定量分析。

2.10 统计学分析 以上实验数据处理均用SPSS 25.0软件系统进行统计分析。各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组与组之间采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验,各组间差异的两两比较,若方差齐则采用最小显著差异法(LSD)-*t*检验,方差不齐采用*T*3检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 实验动物一般行为体征观察 正常组小鼠活动灵敏,毛发丰满柔顺有光泽,大便形状规则呈椭圆形、色黑、质地结实,小鼠无死亡。模型组、三联治疗组、FLA组小鼠在灌胃*H. pylori*后,多嗜睡,毛发不同程度偏黄、色暗,大便形状不规则,质地松散,小鼠无死亡。三联治疗组、FLA低、高剂量组小鼠灌胃给药14 d后,小鼠上述情况均有一定程度好转,给药14 d内小鼠无死亡。

3.2 FLA对小鼠胃重系数、胃液pH的影响 与正常组比较,模型组小鼠胃重系数显著下降,胃液pH显著升高($P<0.01$),胃组织形态发生异常,胃体萎缩,提示器质损伤;与模型组比较,三联治疗组和FLA高剂量组小鼠胃重系数显著上升,胃液pH显著降低($P<0.01$)。见表1、图1。

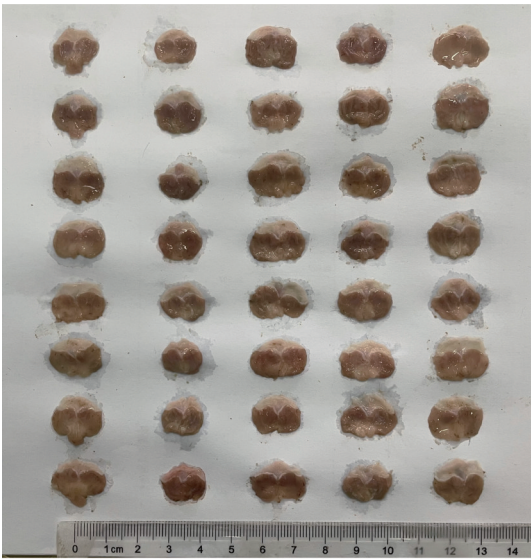
3.3 FLA对小鼠体内*H. pylori*的清除作用 与正常组比较,模型组10只小鼠快速尿素酶均为阳性。

表1 FLA对小鼠胃重系数、胃液pH的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of FLA on stomach weight coefficient and gastric juice pH ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	胃重系数	胃液pH
正常组		1.29±0.22	3.40±1.15
模型组		1.01±0.17 ¹⁾	6.20±0.63 ¹⁾
三联治疗组	2.6+13+6.5	1.27±0.14 ²⁾	3.90±0.88 ²⁾
FLA低剂量组	100	1.09±0.18	3.45±1.04 ²⁾
FLA高剂量组	200	1.26±0.22 ²⁾	2.95±1.36 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$



A B C D E

注:A.正常组;B.模型组;C.三联治疗组;D.FLA低剂量组;E.FLA高剂量组(图2-图4同)

图1 FLA对小鼠胃体的影响

Fig. 1 Effect of FLA on stomach of mice

三联治疗组*H. pylori*阳性率降至10%,FLA低剂量组阳性率为44%,高剂量组阳性率为20%。见表2。

表2 FLA对小鼠胃组织*H. pylori*感染率的影响

Table 2 Effect of FLA on *H. pylori* infection rate in mice gastric tissue

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	<i>n</i>	阴性/例	阳性/例	阳性率/%
正常组		10	10	0	0
模型组		10	0	10	100
三联治疗组	2.6+13+6.5	10	9	1	10
FLA低剂量组	100	9	5	4	44
FLA高剂量组	200	10	8	2	20

3.4 FLA对*H. pylori*胃炎小鼠胃组织病理学改变的影响 正常组小鼠胃组织结构完好,黏膜内胃底

腺排列整齐,黏膜下层未出现水肿,胃底腺与胃黏膜之间排列紧密没有间隙出现。模型组小鼠胃组织明显被破坏,胃底腺排列紊乱,黏膜上皮细胞脱落,黏膜下层水肿,胃底腺与胃黏膜之间间隙显著增大。与模型组比较,三联治疗组小鼠的胃组织结构完整,黏膜内胃底腺排列较整齐,黏膜下层稍有

间隙出现;FLA低剂量组小鼠胃组织结构有所改善,黏膜内胃底腺排列得到好转,黏膜下层间隙较模型组比较有所改善;FLA高剂量组小鼠的胃组织结构更接近于正常组,黏膜内胃底腺排列较整齐,黏膜下层未出现水肿,几乎没有间隙出现。见图2。

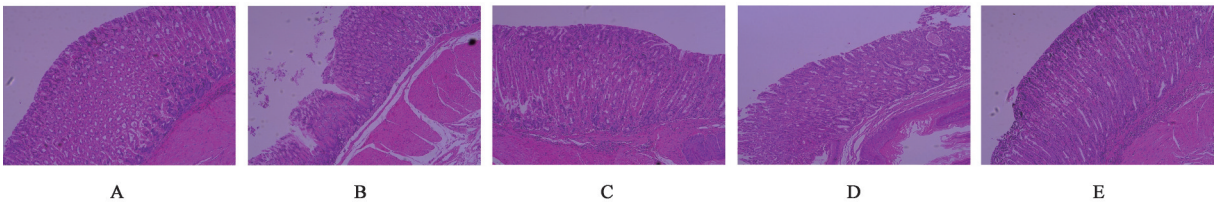


图2 FLA对小鼠胃组织形态学的影响(HE,×100)
Fig. 2 Effect of FLA on gastric histomorphology in mice (HE,×100)

3.5 FLA对小鼠胃黏膜*H. pylori*附着情况的影响
正常组小鼠胃组织上皮细胞完整致密,黏膜连续完整,表面未见*H. pylori*。模型组黏膜脱落,黏膜层不完整,表面定植有杆状、海鸥状的*H. pylori*。

三联治疗组小鼠胃黏膜较为连续完整,表面未见*H. pylori*。FLA低剂量组小鼠胃黏膜较模型组有所好转,表面散在少量杆状*H. pylori*。FLA高剂量组小鼠胃黏膜连续完整,表面未见*H. pylori*。见图3。

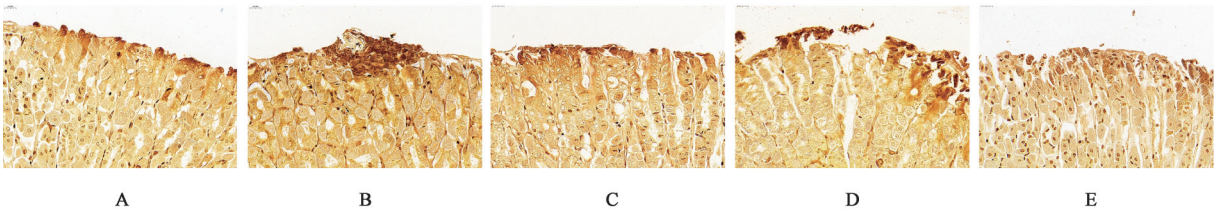


图3 FLA对小鼠胃黏膜*H. pylori*附着情况的影响(Warthin-Starry,×400)
Fig. 3 Effect of FLA on *H. pylori* adherence on surface of stomach in mice (Warthin-Starry, ×400)

3.6 FLA对*H. pylori*胃炎小鼠胃组织中IL-8和MyD88表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠胃组织中IL-8和MyD88的阳性表达显著增强(棕色区域)($P<0.01$);与模型组比较,三联治疗组和FLA高剂量组炎症因子IL-8的阳性表达明显减弱,差异具有统计学意义($P<0.05$),各给药组MyD88的阳性表达显著减弱,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表3、图4。

3.7 FLA对*H. pylori*胃炎小鼠血清中炎症因子IL-8、IL-6、TNF- α 和IL-1 β 表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清内炎症因子IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 水平显著上升($P<0.01$);与模型组比较,三联治疗组小鼠血清中IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 含量显著下降($P<0.01$),FLA低剂量组血清IL-8含量下降($P<0.01$),高剂量组血清IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 含量均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),且FLA给药组对小鼠血清内炎症因子IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 的抑制作用呈现一定的剂量依

表3 FLA对小鼠胃组织中IL-8和MyD88表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of FLA on expression levels of IL-8 and MyD88 in stomach tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MyD88	IL-8
正常组		20.68±1.98	9.96±1.36
模型组		88.42±7.39 ¹⁾	110.17±8.57 ¹⁾
三联治疗组	2.6+13+6.5	51.45±7.54 ³⁾	50.67±3.01 ²⁾
FLA低剂量组	100	55.95±5.26 ³⁾	73.87±2.69
FLA高剂量组	200	39.25±4.97 ³⁾	61.47±4.10 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表4同)

耐性。见表4。

3.8 FLA对*H. pylori*感染GES-1细胞PI3K/Akt蛋白表达水平的影响 与空组比较,*H. pylori*感染后的GES-1细胞p-PI3K相对表达水平显著升高($P<0.01$)。与*H. pylori*感染后的GES-1细胞组比较FLA 8、16 mg·L⁻¹给药剂量组GES-1细胞的

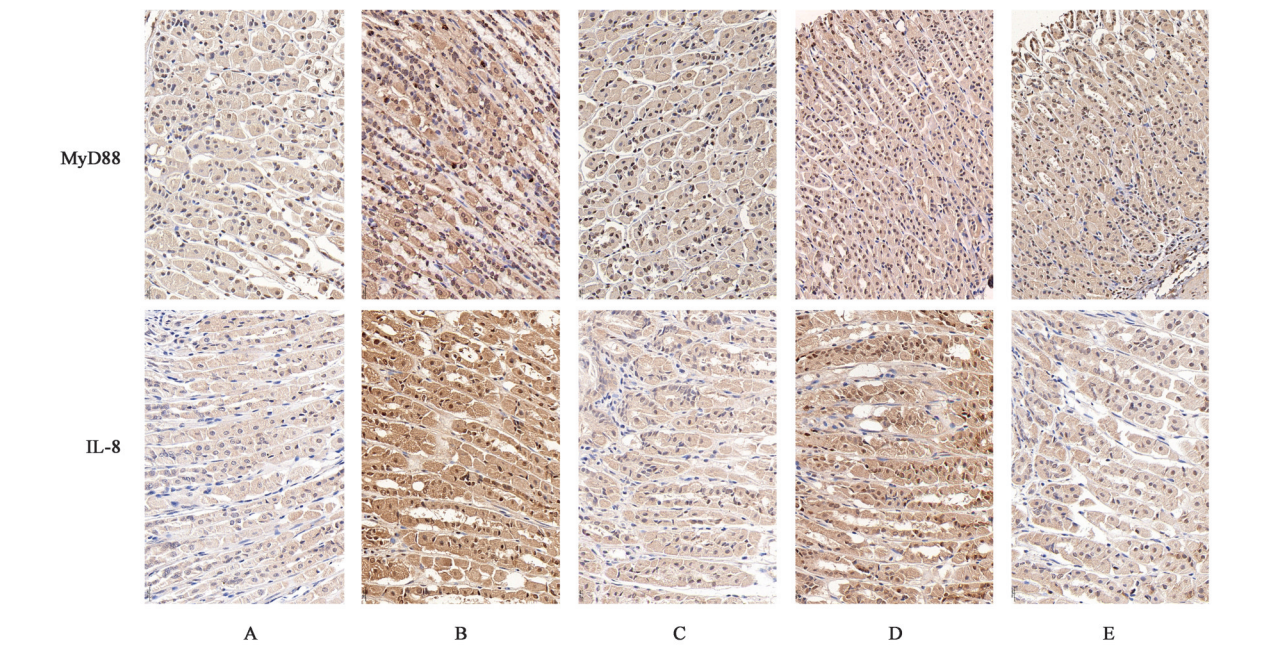


图4 FLA对小鼠胃组织中IL-8和MyD88蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of FLA on IL-8 and MyD88 proteins expression in stomach tissue of mice (IHC,×400)

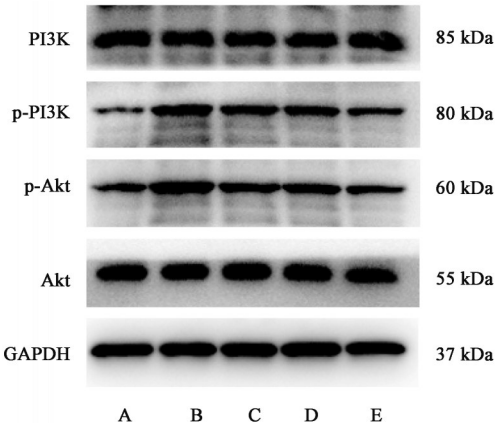
表4 FLA对 <i>H. pylori</i> 胃炎小鼠血清IL-6、TNF-α、IL-8和IL-1β水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)					
Table 4 Effect of FLA on serum IL-6, TNF-α, IL-8 and IL-1β levels in <i>H. pylori</i> gastritis mice($\bar{x}\pm s, n=6$)					
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6	TNF-α	IL-8	IL-1β
正常组		15.64±1.97	61.79±11.28	26.93±4.66	6.03±0.81
模型组		23.26±2.65 ¹⁾	114.6±23.34 ¹⁾	44.78±2.67 ¹⁾	13.10±2.44 ¹⁾
三联治疗组	2.6+13+6.5	16.37±4.58 ³⁾	84.05±11.31 ³⁾	37.15±4.50 ³⁾	8.13±2.31 ³⁾
FLA低剂量组	100	19.89±2.95	105.84±12.02	37.25±2.44 ³⁾	11.35±2.43
FLA高剂量组	200	17.39±2.75 ³⁾	94.78±9.66 ²⁾	32.25±2.54 ³⁾	9.90±2.89 ²⁾

p-PI3K 相对表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。与空白组比较, *H. pylori* 感染后的 GES-1 细胞 p-Akt 相对表达水平显著升高($P<0.01$)。与 *H. pylori* 感染后的 GES-1 细胞组比较, FLA 4、8、16 mg·L⁻¹ 给药剂量组 GES-1 细胞的 p-Akt 相对表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$), 且呈现剂量依赖性。见表5、图5。

表5 FLA对*H. pylori*感染GES-1细胞PI3K/Akt信号通路蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of FLA on protein expression of PI3K/Akt signaling pathway in <i>H. pylori</i> infected GES-1 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)			
组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
空白组		0.44±0.10	0.51±0.06
模型组		0.87±0.12 ¹⁾	0.90±0.09 ¹⁾
FLA组	4	0.71±0.09	0.68±0.06 ²⁾
	8	0.67±0.09 ²⁾	0.60±0.11 ³⁾
	16	0.50±0.07 ³⁾	0.47±0.13 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$



注:A.空白组;B.模型组;C.FLA低质量浓度组;D.FLA中质量浓度组;E.FLA高质量浓度组

图5 各组细胞PI3K/Akt蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of PI3K/Akt protein expression in cells of each group

4 讨论

H. pylori 定植于胃黏膜表面,在其生长、代谢的过程中会释放脲酶、毒力因子、脂多糖等产物,这些

代谢产物不断刺激胃组织最终造成胃黏膜损伤和炎症^[21]。本实验通过构建 *H. pylori* 胃炎小鼠模型,明确了FLA的抗 *H. pylori* 胃炎作用,具体表现为显著升高因 *H. pylori* 感染引起的小鼠胃液pH下降、降低 *H. pylori* 阳性率及改善胃组织结构性损伤。

炎症反应始终贯穿 *H. pylori* 胃炎的整个过程中。*H. pylori* 表面的脂多糖能够诱导胃黏膜上的Toll样受体2(TLR2)表达,从而激活核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,产生炎症反应^[22]。*H. pylori* 自身产生的尿素酶可以激活胃黏膜表面的炎症小体的表达,进一步激活下游的NF- κ B、PI3K/Akt等通路促进IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 炎症因子的产生和释放。MyD88是TLR2炎症小体激活NF- κ B信号通路的关键蛋白分子^[23]。IL-8是一种多功能免疫调节趋化因子,*H. pylori* 释放的毒力因子会与胃上皮细胞相互作用,诱导上皮细胞产生IL-8。IL-8的长时间积累会导致白细胞募集到感染区域,进而导致炎症细胞产生促炎细胞因子和诱导炎症介质^[24-25]。

免疫组化结果显示,不同剂量FLA给药能够抑制 *H. pylori* 诱导的小鼠胃组织中炎症因子IL-8、MyD88表达水平的升高,相较于低剂量给药组,高剂量给药组对炎症因子IL-8、MyD88的改善作用更强,呈现一定的剂量依赖性。ELISA实验结果同样显示,不同剂量FLA给药能够抑制 *H. pylori* 诱导的小鼠血清中炎症因子IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 表达水平的升高,且200 mg·kg⁻¹ FLA给药组对炎症因子IL-6、TNF- α 、IL-8和IL-1 β 的抑制作用更强,呈现出剂量依赖性。

PI3K/Akt信号通路在细胞的生长代谢过程中起着关键的调节作用,*H. pylori* 自身所释放的毒性因子能够通过PI3K/Akt信号通路逆调控自噬,进而激活NF- κ B信号通路,从而增加IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和IL-8等炎症细胞因子的表达,加重炎症反应^[26-28]。*H. pylori* 感染GES-1细胞后,PI3K/Akt信号通路被激活,PI3K和Akt的磷酸化水平显著升高。经FLA给药后,PI3K和Akt的磷酸化水平显著降低,PI3K/Akt信号通路的激活被抑制,以上结果说明,FLA能够抑制 *H. pylori* 感染的GES-1细胞PI3K/Akt信号通路的激活。

综上所述,FLA可通过改善胃重系数及胃液pH、降低 *H. pylori* 阳性率、抑制炎症因子释放等多途径治疗 *H. pylori* 胃炎,其作用机制与抑制PI3K/Akt信号通路有关。该研究从清除 *H. pylori*、抑制

PI3K/Akt信号通路的激活从而抑制炎症角度初步阐释了FLA治疗 *H. pylori* 胃炎的作用机制,为进一步研究开发FLA用于治疗 *H. pylori* 胃炎奠定了基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 万慧颖,李超,李薇,等. 中药抗幽门螺杆菌作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(3): 203-212.
WAN H Y, LI C, LI W, et al. Anti-*Helicobacter pylori* mechanism of Chinese medicine: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(3): 203-212.
- [2] TSHIBANGU-KABAMBA E, YAMAOKA Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance-from biology to clinical implications [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(9): 613-629.
- [3] 唐旭东,王凤云,张声生,等. 消化系统常见病慢性非萎缩性胃炎中医诊疗指南(基层医生版)[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3613-3618.
TANG X D, WANG F Y, ZHANG S S, et al. Guidelines on Chinese medicine diagnosis and treatment of chronic non-atrophic gastritis, a common disease of the digestive system (primary care Doctor's edition) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(8): 3613-3618.
- [4] 苑旭晔,陈宏桢,郭金波,等. 《第六次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告(非根除治疗部分)》解读[J]. 河北医科大学学报, 2023, 44(3): 249-251.
YUAN X Y, CHEN H Z, GUO J B, et al. *Helicobacter pylori* study group, Chinese society of gastroenterology, Chinese medical association [J]. J Hebei Med Univ, 2023, 44(3): 249-251.
- [5] LAI Y, WEI W, DU Y, et al. Biomaterials for *Helicobacter pylori* therapy: Therapeutic potential and future perspectives [J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2120747.
- [6] CHEY W D, LEONTIADIS G I, HOWDEN C W, et al. Correction: ACG clinical guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* infection [J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113(7): 1102.
- [7] 杜丽梦,呼圣娟. 幽门螺杆菌抗生素耐药影响因素的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(19): 61-65.
DU L M, HU S J. Research progress on factors influencing antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* [J]. Chin J Mod Med, 2023, 33(19): 61-65.
- [8] 许慧梅,杨一蕃,程龙,等. 西他沙星在幽门螺杆菌根除治疗中的应用进展[J]. 医药导报, 2021, 40(8): 1081-1085.
XU H M, YANG Y F, CHEN L, et al. Progress in the application of sitafloxacin in the eradication therapy of *Helicobacter pylori* [J]. Her Med, 2021, 40(8): 1081-1085.
- [9] LI X, XU J, WANG X, et al. Banxia Xiexin decoction treating gastritis mice with drug-resistant *Helicobacter pylori* and its mechanism [J]. World J Gastroenterol, 2023, 29(18): 2818-

- 2835.
- [10] 张思依,吕文亮,徐婧,等. 基于NLRP3炎症小体通路探讨连朴饮对幽门螺杆菌感染大鼠胃黏膜损伤的保护机制[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(1): 81-84.
- ZHANG S Y, LV W L, XU J, et al. Protective mechanism of gastric mucosal injury in *Helicobacter pylori*-infected rats by Lianpu drink based on NLRP3 inflammatory vesicle pathway [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(1): 81-84.
- [11] 柴雪,李晓亮. 高良姜-香附药对抗胃溃疡及镇痛作用的研究[J]. 中医药学报, 2023, 51(6): 38-42.
- CHAI X, LI X L. Gastric ulcer and analgesic effects of Gaoliangjiang-Xiangfu[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2023, 51(6): 38-42.
- [12] OUYANG J, SUN F, FENG W, et al. Antimicrobial activity of Galangin and its effects on murein hydrolases of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strain Mu50[J]. Chemotherapy, 2018, 63(1): 20-28.
- [13] ZHANG B, DAI Y, LIAO Z, et al. Three new antibacterial active diarylheptanoids from *Alpinia officinarum* [J]. Fitoterapia, 2010, 81(7): 948-952.
- [14] LIN K, WANG Y, GONG J, et al. Protective effects of total flavonoids from *Alpinia officinarum* rhizoma against ethanol-induced gastric ulcer *in vivo* and *in vitro* [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 854-862.
- [15] MA X, YOU P, XU Y, et al. Anti-*Helicobacter pylori*-associated gastritis effect of the ethyl acetate extract of *Alpinia officinarum* Hance through MAPK signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 260: 113100.
- [16] 马小青,杨敏,涂仪军,等. 高良姜抗幽门螺杆菌相关性胃炎有效部位的筛选及对NF- κ B信号通路的抑制作用[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3838-3842.
- MA X Q, YANG M, TU Y J, et al. Study on effective fraction screening of *Alpiniae officinarum* Rhizoma against *H. pylori* related gastritis and its inhibitory effect on NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(7): 3838-3842.
- [17] 罗鑫,郑吴殷晓,詹健婷,等. 基于“敲除策略”筛选高良姜乙酸乙酯部位抗幽门螺杆菌胃炎活性成分[J]. 医药导报, 2024, 43(9): 1387-1392.
- LUO X, ZHENG W Y X, ZHAN J T, et al. Screening of anti-*Helicobacter pylori* gastritis active component of the ethyl acetate extract of *Alpinia officinarum* Hance based on the knockout strategy[J]. Her Med, 2024, 43(9): 1387-1392.
- [18] TANG Q, MA Z, TANG X, et al. Coptisine inhibits *Helicobacter pylori* and reduces the expression of CagA to alleviate host inflammation *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 314: 116618.
- [19] 马小青. 高良姜抗胃炎活性部位的筛选及作用机制研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2019.
- MA X Q. Screening for the anti-gastritis active fraction of *Alpinia officinarum* and studies on its mechanism [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2019.
- [20] 秦华珍,牛新迈,谢旭格,等. 高良姜、大高良姜黄酮类成分对胃溃疡寒证大鼠胃组织PGE₂、EGF和血清IL-8、TNF- α 等指标的影响[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(11): 2612-2614.
- QING H Z, NIU X M, XIE X G, et al. Effects of flavonoid components of galangal and greater galangal on PGE₂, EGF and serum IL-8 and TNF- α in gastric tissues of rats with gastric ulcer cold evidence [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(11): 2612-2614.
- [21] ZHOU J, LI C, TAN L, et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* and its associated urease by palmitate: Investigation on the potential mechanism [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0168944.
- [22] CHAVARRÍA-VELÁZQUEZ C O, TORRES-MARTÍNEZ A C, MONTAÑO L F, et al. TLR2 activation induced by *H. pylori* LPS promotes the differential expression of claudin-4, -6 -7 and -9 via either STAT3 and ERK1/2 in AGS cells [J]. Immunobiology, 2018, 223(1): 38-48.
- [23] XUN Y, YANG H, KAMINSKA B, et al. Toll-like receptors and Toll-like receptor-targeted immunotherapy against glioma [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 176.
- [24] ANG T, WANG R, ZHANG J, et al. Mechanism of berberine in treating *Helicobacter pylori* induced chronic atrophic gastritis through IRF8-IFN- γ signaling axis suppressing [J]. Life Sci, 2020, 248: 117456.
- [25] YOSHIDA N, YOSHIKAWA T, TANAKA Y, et al. A new mechanism for anti-inflammatory actions of proton pump inhibitors--inhibitory effects on neutrophil-endothelial cell interactions [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2000, 14(Suppl 1): 74-81.
- [26] LEE J, LIM J W, KIM H. Astaxanthin inhibits matrix metalloproteinase expression by suppressing PI3K/Akt/mTOR activation in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells [J]. Nutrients, 2022, 14(16): 3427.
- [27] 王杰,杜朋丽,董佳琪,等. 黄连碱对慢性萎缩性胃炎大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(18): 117-124.
- WANG J, DU P L, DONG J Q, et al. Effect of coptisine on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in chronic atrophic gastritis rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(18): 117-124.
- [28] 谢佳雨,柳钰书,朱菲亚,等. 人参皂苷Rb₁通过PI3K/Akt信号通路对LPS炎症小鼠的神经保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(19): 81-89.
- XIE J Y, LIU Y S, ZHU F Y, et al. Neuroprotective effect of ginsenoside Rb₁ on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice based on PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(19): 81-89.

[责任编辑 周冰冰]