

· 实验研究 ·

参苓白术散通过 TLR4/NFκB/Nrf2 通路和自噬对脂多糖诱导的 GES-1 细胞炎症反应的影响

范春兰, 张润, 王洪平, 尹琼, 李品, 马全涛, 杨涵, 李晋生, 王志斌*

北京同仁堂股份有限公司 科学研究所, 北京 100079

摘要: 目的 探讨参苓白术散对幽门螺旋杆菌脂多糖诱导人胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 炎症反应的影响及作用机制。方法 建立幽门螺旋杆菌脂多糖诱导的 GES-1 细胞炎症模型。采用 Griess 法检测一氧化氮 (NO) 释放水平; CCK8 法检测细胞活力; ELISA 检测炎症细胞因子 [肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 β] 的水平; 荧光探针染色检测细胞活性氧 (ROS) 和 Caspase 3/7 含量; 荧光探针 JC-1 观察 GES-1 细胞线粒体膜电位的变化; 免疫荧光技术检测核因子- κ B (NF- κ B) p65 的核转位情况; 荧光定量 PCR 检测 Toll 样受体 4 (TLR4) 和核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 的基因表达水平; 透射电镜观察细胞中自噬小体数量; 蛋白质免疫印迹法检测 TLR4、Nrf2、LC3II 和 p62 蛋白的表达水平。结果 与模型组比较, 参苓白术散 6.25、12.5 μ g/mL 组可显著降低细胞上清 NO 含量 ($P < 0.01$); 参苓白术散 6.25、12.5 μ g/mL 组能显著降低 IL-6 和 IL-1 β 含量, 参苓白术散 12.5 μ g/mL 组能显著降低 TNF- α 含量 ($P < 0.05$ 、0.01); 参苓白术散 6.25、12.5 μ g/mL 组 ROS 生成显著减少 ($P < 0.05$ 、0.01); 参苓白术散 12.5 μ g/mL 组细胞线粒体膜电位水平显著提高 ($P < 0.05$); 参苓白术散可以显著抑制细胞 NF- κ B p65 核位移 ($P < 0.05$); 参苓白术散 12.5 μ g/mL 组 Caspase 3/7 绿色荧光强度显著降低 ($P < 0.05$); 参苓白术散 12.5 μ g/mL 组细胞 TLR4 蛋白相对表达量显著降低、Nrf2 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$), 参苓白术散各剂量组 TLR4 mRNA 相对表达量均显著降低 ($P < 0.01$), 参苓白术散 6.25、12.5 μ g/mL 组 Nrf2 mRNA 相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。参苓白术散能够提高脂多糖环境下 GES-1 细胞内自噬小体的数量。与模型组比较, 参苓白术散 12.5 μ g/mL 组细胞内 LC3II 表达显著升高, p62 表达显著降低 ($P < 0.05$)。结论 参苓白术散能改善脂多糖诱导的 GES-1 细胞炎症反应, 其作用机制可能与调节 TLR4/NF- κ B/Nrf2 信号通路和促进细胞自噬有关。

关键词: 参苓白术散; 人胃黏膜上皮细胞; 脂多糖; 炎症反应; Toll 样受体 4/核因子 E2 相关因子 2 信号通路; 自噬

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)09-2193-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.09.001

Effects of Shenling Baizhu Powder on lipopolysaccharide-induced inflammatory response of GES-1 cells through TLR4/NFκB/Nrf2 pathway and autophagy

FAN Chunlan, ZHANG Run, WANG Hongping, YIN Qiong, LI Pin, MA Quantao, YANG Han, LI Jinsheng, WANG Zhibin

Beijing Tongrentang Co., Ltd. Scientific Research Institute, Beijing 100079, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory effect of Shenling Baizhu Powder on human gastric mucosal epithelial cell (GES-1) induced by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide, and its mechanism. **Methods** The lipopolysaccharide-induced GES-1 cell inflammation model was established. NO production was assessed by Griess reagent. Cell viability was determined by CCK8 assay. The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in cell culture supernatant were measured by ELISA. ROS production were detected through fluorescent probe assay. Caspase 3/7 activation was evaluated using Caspase 3/7 Green Ready Probe. JC-1 was used for the detection

收稿日期: 2024-07-25

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09201-011)

作者简介: 范春兰, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药理学研究。E-mail: fanchunlan77@163.com

*通信作者: 王志斌, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药质量控制标准及药理学研究。E-mail: wangzhibin4804@126.com

of the mitochondrial membrane potential. NF- κ B was detected by immunofluorescence. *TLR4* and *Nrf2* mRNA expression were detected by qRT-PCR. Transmission electron microscopy was applied to observe the number of autophagosomes in GES-1 cells. The expression levels of *TLR4*, *Nrf2*, *LC3II* and *p62* were determined by Western blotting. **Results** Compared with model groups, Shenling Baizhu Powder 6.25 and 12.5 μ g/mL groups could significantly reduce the content of NO in cell supernatant ($P < 0.01$). The contents of IL-6 and IL-1 β in Shenling Baizhu Powder 6.25 and 12.5 μ g/mL groups were significantly decreased, and the contents of TNF- α in Shenling Baizhu Powder 12.5 μ g/mL groups were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). Compared with model group, ROS production in Shenling Baizhu Powder 6.25 and 12.5 μ g/mL groups was significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). The level of mitochondrial membrane potential in Shenling Baizhu Powder 12.5 μ g/mL group was significantly increased ($P < 0.05$), Shenling Baizhu Powder could significantly inhibit NF- κ B p65 nuclear shift ($P < 0.05$). Compared with model group, the green fluorescence intensity of Caspase 3/7 in Shenling Baizhu Powder 12.5 μ g/mL group was significantly decreased ($P < 0.05$). The relative expression levels of *TLR4* in Shenling Baizhu Powder 12.5 μ g/mL group were significantly decreased, while *Nrf2* expression levels significantly increased ($P < 0.05$), and the relative expression levels of *TLR4* mRNA in each dose group were significantly decreased ($P < 0.01$). The relative expression of *Nrf2* mRNA in Shenling Baizhu Powder groups 6.25 and 12.5 μ g/mL were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). Shenling Baizhu Powder can increase the number of autophagosomes in GES-1 cells in lipopolysaccharide environment. Compared with model group, *LC3II* expression in Shenling Baizhu Powder 12.5 μ g/mL group was significantly increased, and *p62* expression was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Shenling Baizhu Powder mitigated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in GES-1 cells, which may be associated with the *TLR4*/NF κ B/*Nrf2* signaling pathway and activating autophagy.

Key words: Shenlin Baizhu Power; human gastric mucosal epithelial cell; lipopolysaccharide; inflammatory response; *TLR4*/NF- κ B signaling pathway; autophagy

幽门螺杆菌 (Hp) 感染是消化道疾病发展的关键因素, 包括慢性胃炎、消化性溃疡以及胃癌^[1]。据统计, 全球约有一半人口被 Hp 感染, 且几乎所有 Hp 感染者都存在慢性活动性胃炎^[2]。根据第 5 次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告, 推荐铋剂四联作为根除 Hp 的主要治疗方法^[3]。西医根除 Hp 的疗效受抗生素耐药性等因素的影响, 在改善临床症状方面尚待提高。目前已有较多研究证实了多种中药单体及复方制剂有抑制或根除 Hp 的作用^[4-6], 对 Hp 脂多糖诱导的胃黏膜炎症损伤具有保护作用^[7-8]。因此, 从中医中药的角度探讨治疗幽门螺旋杆菌胃炎具有广阔的前景。

参苓白术散出自宋代官修《太平惠民和剂局方》, 由人参、茯苓、白术、山药、白扁豆、莲子、薏苡仁、砂仁、桔梗和甘草组成。临床主治脾虚夹湿证, 其组方严谨、配方得当、疗效确切, 受到历代医家的广泛重视。临床研究表明, 参苓白术散辅助治疗伴 Hp 感染的慢性萎缩性胃炎的疗效显著, 可以明显减轻患者的临床症状, 改善胃镜下黏膜血流变化, 且用药安全^[9]; 参苓白术散加减辅助治疗对改善幽门螺旋杆菌胃湿症状效果显著^[10]。但是参苓白术散治疗胃炎的相关作用机制尚未明确。故本实验拟采用 Hp 脂多糖诱导人胃黏膜上皮细胞 GES-1, 建立胃黏膜细胞体外炎症

模型, 探讨参苓白术散的抗炎作用及相关机制, 为其在治疗胃黏膜炎症损伤方面的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 (货号 CTCC-002-0010), 购自浙江美森细胞科技有限公司。

1.2 药物及试剂

参苓白术散(北京同仁堂股份有限公司制药厂, 规格 12 g/袋, 批号 22101003); RPMI 1640 细胞培养基 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号 2572138); 胎牛血清 (FBS, 默克美国 sigma aldrich 公司, 批号 WXBD2091V); Hp 脂多糖[卡迈舒(上海)生物科技有限公司, 批号 22111601]; CCK8 试剂盒 (北京翱擎生物科技有限公司, 批号 2022005); 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (北京百瑞极生物科技有限公司, 批号 20230417); 活性氧 (ROS) 探针 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 062221210917); 线粒体膜电位检测试剂盒 (北京百瑞极生物科技有限公司, 批号 20230308); 人肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (美国 Proteintech Group 公司, 批号 KE00154,); 人白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (深圳达科为生物技术有限公司, 批号: 72305-2); 人 IL- β ELISA 试剂盒 (美国 Proteintech Group

公司, 批号 KE00021); 动物组织细胞总 RNA 提取试剂盒 (深圳达科为生物技术有限公司, 批号 TR22101); NovoScript®Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (苏州近岸蛋白质科技股份有限公司, 批号 0522011); NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus (苏州近岸蛋白质科技股份有限公司, 批号 05229413); CellEvent Caspase-3/7 Green ReadyProbes 试剂 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号 2486621); 兔源核因子- κ B (NF- κ B) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 8242S); 兔源核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 12721S); 兔源 LC3 A/B 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 4108S); 兔源 p62 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 39749S); 兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 2118S); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 7074S); IRDye 680CW Goat anti-Rabbit 荧光 WB 二抗 (美国 LI-COR 公司, 批号 D11103-051)。

1.3 主要仪器

311 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); Epoch2 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); Nanodrop One 核酸定量仪 (美国 Thermo Scientific 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Scientific 公司); 垂直电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); LI-COR 双色荧光与发光成像仪 (美国 LI-COR 公司); Operetta CLS 高内涵细胞分析仪 (美国 PerkinElmer 公司)。透射电子显微镜 (日本 hitachi 公司)。

1.4 细胞培养

人胃黏膜上皮细胞 GES-1 用含 10% FBS 的 1640 完全培养基进行培养, 加入 1% 青链霉素, 置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱, 隔天换液。培养于培养瓶中, 待细胞达到 70%~80% 汇合时进行 1:2 传代培养。

1.5 Griess 法检测 NO 释放水平

将 GES-1 细胞接种于 24 孔培养板上, 每孔 6×10^4 个细胞, 分别加入不同质量浓度 (0.5、1、2、4 μ g/mL) 脂多糖孵育 24 h。培养 24 h 后收集细胞培养液, 96 孔板每孔加入培养液 100 μ L, 再加入 Griess 试剂 100 μ L, 在室温孵育 10 min 后, 在酶标仪 490 nm 测定吸光度 (A), 利用 NaNO₂ 标准曲线

计算 NO 的生成量。

1.6 CCK8 法检测细胞的增殖活力

取对数生长期的 GES-1 细胞, 按每孔 6×10^3 个的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L。培养 24 h 待细胞贴壁后, 吸弃培养液。对照组加入完全培养基, 模型组加入含 1 μ g/mL 脂多糖的培养液, 参苓白术散组在模型组的基础上分别加入含终质量浓度为 3.13、6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 μ g/mL 的参苓白术散, 设 5 个复孔, 药物作用 24 h 后, 吸弃培养液; 每孔加入 10 μ L CCK8 溶液, 37 °C 避光孵育 1 h, 置于酶标仪中于 490 nm 波长下测定各孔 A 值。参苓白术散采用 DMSO 制备母液, 并采用培养基稀释到相应浓度, 并设立 DMSO 溶剂对照组。

$$\text{细胞活性} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{溶剂对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{溶剂对照}})$$

1.7 细胞分组与处置方法

将细胞随机分为对照组、模型组、参苓白术散 (3.13、6.25、12.5 μ g/mL) 组。对照组正常培养, 模型组用 1 μ g/mL 幽门螺旋杆菌脂多糖处理细胞 24 h 以建立 GES-1 细胞炎症模型。参苓白术散组在模型组的基础上分别用 3.13、6.25、12.5 μ g/mL 参苓白术散处理细胞 24 h。

1.8 ELISA 法检测细胞上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量

将 GES-1 细胞接种于 24 孔板中, 细胞密度为每孔 6×10^4 个, 每孔 1 mL, 培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液, 细胞分组及给药同 1.7 项下。给药干预后, 收集细胞上清液, 3 000 r/min, 离心半径 9.5 cm, 离心 10 min 去除沉淀物。按照 ELISA 试剂盒说明书要求操作, 检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量。

1.9 荧光探针法检测细胞 ROS 含量

GES-1 细胞以 6×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液, 细胞分组及给药同 1.7 项下。用无血清培养基 1:5 000 稀释 Mito-Tracker Green 探针, 使终浓度为 20 μ mol/L。弃培养基, 每孔加入 200 μ L 稀释的 Mito-Tracker Green 探针。37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min, 用无血清培养基洗 3 遍, 充分洗去 Mito-Tracker Green 探针, 采用高内涵细胞分析系统观察, Harmony 4.9 软件分析荧光强度值。

1.10 JC-1 探针法检测线粒体膜电位

GES-1 细胞以 6×10^3 个/孔的密度接种于 96

孔板内，每孔 100 μL ，培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液，细胞分组及给药同 1.7 项下。用双蒸水 1:100 稀释 JC-1 探针。弃培养基，每孔加入 100 μL 稀释的 JC-1 探针。37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 15 min，用 PBS 清洗 3 遍，采用高内涵细胞分析系统观察，Harmony 4.9 软件分析荧光强度值。

1.11 免疫荧光法检测 NF- κB 核转位

将 GES-1 细胞以 6×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板内，每孔 100 μL ，培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液，细胞分组及给药同 1.7 项下。给药干预后，用 PBS 洗涤细胞 3 次，4% 多聚甲醛固定 15 min，PBS 清洗细胞 3 次；采用 0.1% TritonX-100 破膜 3 min，PBS 清洗细胞 3 次；10% 山羊血清封闭 1 h 之后孵育 NF- κB p65 抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜；次日 PBS 洗涤 3 次，予相应种属二抗孵育；最后用 PBS 清洗细胞 3 次后，DAPI 进行细胞核染色，采用高内涵细胞分析系统进行观察，Harmony 4.9 软件分析细胞的荧光强度值。

1.12 荧光探针法检测 GES-1 细胞凋亡

将 GES-1 细胞以 6×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板内，每孔 100 μL ，培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液，细胞分组及给药同 1.7 项下。给药干预后，加入终质量浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cell EventTM Caspase-3/7 绿色检测荧光试剂，然后在 4% 多聚甲醛固定液中固定 15 min，PBS 清洗 3 次，采用高内涵细胞分析系统观察，Harmony 4.9 软件分析细胞荧光强度值。

1.13 Western blotting 法检测 GES-1 细胞 Toll 样受体 4 (TLR4)、Nrf2、LC3II、p62 蛋白表达

将 GES-1 细胞以 3×10^5 个/孔的密度接种于 60 mm 培养皿中，每个培养皿 5 mL。培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液，细胞分组及给药同 1.7 项下。给药干预后，收集细胞。加入 RIPA 裂解液，冰浴裂解 20 min，12 000 r/min，离心半径 9.5 cm，离心 10 min，上清液即为细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度，98 $^{\circ}\text{C}$ 变性，进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、冰浴电转，5% BSA 封闭液室温孵育 1 h，加入相应的一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，洗涤 3 次。二抗孵育 1 h，洗涤 3 次。蛋白条带图像用 LI-COR 图像软件进行灰度和荧光强度分析，并除以内参蛋白 GAPDH 灰度值/荧光值，得到待测蛋白的相对表达水平。

1.14 实时荧光定量 PCR 检测 TLR4 和 Nrf2 基因表达

将 GES-1 细胞按每孔 1.2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液，细胞分组及给药同 1.7 项下。给药干预后，收集细胞，采用 RNA 提取试剂盒提取 GES-1 细胞总 RNA，检测 RNA 含量和纯度。采用近岸蛋白逆转录试剂盒进行逆转录反应，反应条件为：95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，共 40 个循环，4 $^{\circ}\text{C}$ 保持。然后进行 PCR 反应，反应体系为 20 μL ，反应条件：预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s，退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s，延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s，共 40 个循环。扩增后进行熔解曲线分析，判断产物是否有非特异性扩增；分析扩增曲线，计算 Ct 值。以 β -actin 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组间 mRNA 表达水平差异，对照组基因表达量设为 1；实验重复 3 次。引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequence for qPCR

基因	引物序列 (3'-5')	长度/bp
TLR4	正向: GATAGCGAGCCACGCATTCA	166
	反向: TAGGAACCACCTCCACGCA	
Nrf2	正向: AGGTTGCCACATTCCTCCAAA	118
	反向: AGTGACTGAAACGTAGCCGA	
β -actin	正向: GTCATTCCAAATATGAGATGCGT	121
	反向: GCTATCACCTCCCCTGTGTG	

1.15 透射电镜观察各组细胞自噬小体的数量

GES-1 细胞密度调整为 1.2×10^5 个/mL，接种于 6 孔板中，每孔 2 mL 细胞混悬液，细胞分组及给药同 1.7 项下。收集各实验组细胞，于 2.5% 的戊二醛组织固定液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h，1% 的四氧化锇 37 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h，PBS 清洗，梯度乙醇、100% 丙酮脱水渗透并包埋；包埋样品于超薄切片机切成 60~80 nm 的薄片，铀铅双染色法染色，置于透射电子显微镜下观察拍照。

1.16 统计学处理方法

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。研究数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据若满足方差齐性，采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验；若方差不齐，多组间比较及两两比较均采用 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 参苓白术散对 GES-1 细胞 NO 释放和细胞增殖活力的影响

与对照组比较,脂多糖刺激 GES-1 细胞 24 h 后,脂多糖 1、2、4 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 NO 释放明显增加,且呈剂量相关性 ($P < 0.01$),见图 1。选择 1 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖刺激 GES-1 细胞 24 h 作为后续实验条件。

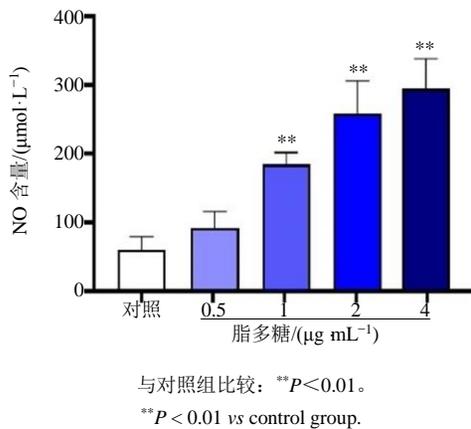


图 1 脂多糖刺激的 GES-1 细胞 NO 释放量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effects of lipopolysaccharide on nitric oxide release in GES-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

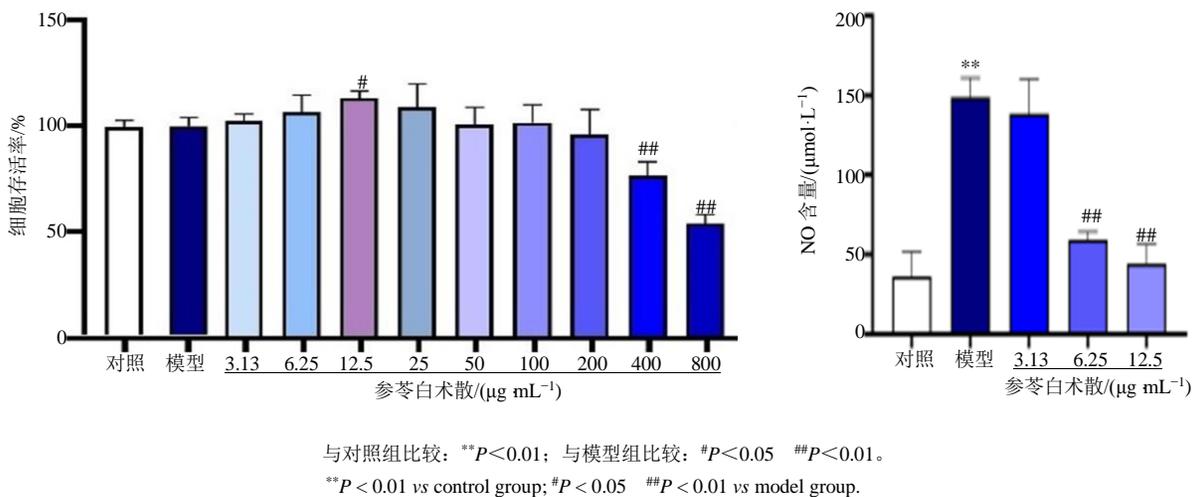


图 2 参苓白术散对脂多糖刺激的 GES-1 细胞 NO 释放和细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of Shenling Baizhu Power on nitric oxide release and cell viability in lipopolysaccharide-induced GES-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

6.25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组 ROS 生成显著减少 ($P < 0.05$ 、0.01), 见图 4。

2.4 参苓白术散对 GES-1 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变代表细胞膜电位的下降。结果显示,与对照组比较,模型组

给药 24 h 后,与对照组比较,模型组细胞增殖活力无明显变化;与模型组比较,参苓白术散 400、800 $\mu\text{g/mL}$ 组 GES-1 细胞的存活率明显降低 ($P < 0.01$),提示因为浓度过高对细胞造成损伤。与模型组比较,参苓白术散质量浓度为 3.13~200 $\mu\text{g/mL}$ 时对细胞无明显损伤作用,其中参苓白术散 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组对 GES-1 细胞的增殖活力有显著的促进作用 ($P < 0.05$),见图 2。故选择 3.13、6.25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 作为后续参苓白术散的给药浓度。由图 2 可见,参苓白术散 6.25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组可显著降低细胞上清 NO 含量 ($P < 0.01$)。

2.2 参苓白术散对 GES-1 细胞炎症因子的影响

与对照组比较,模型组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,参苓白术散 6.25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组能显著降低 IL-6 和 IL-1 β 含量,参苓白术散 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组能显著降低 TNF- α 含量 ($P < 0.05$ 、0.01)。表明参苓白术散可抑制脂多糖诱导的 GES-1 细胞炎症因子的释放,见图 3。

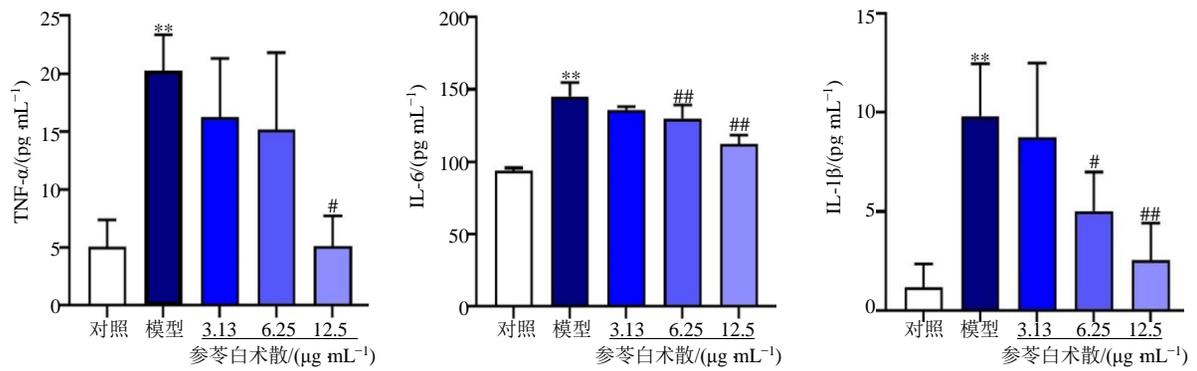
2.3 参苓白术散对 GES-1 细胞 ROS 生成的影响

与对照组比较,模型组 GES-1 细胞 ROS 生成显著增加 ($P < 0.01$);与模型组相比,参苓白术散

细胞线粒体膜电位水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,参苓白术散 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞线粒体膜电位水平显著提高 ($P < 0.05$),见图 5。

2.5 参苓白术散对 GES-1 细胞 NF- κB p65 核转位的影响

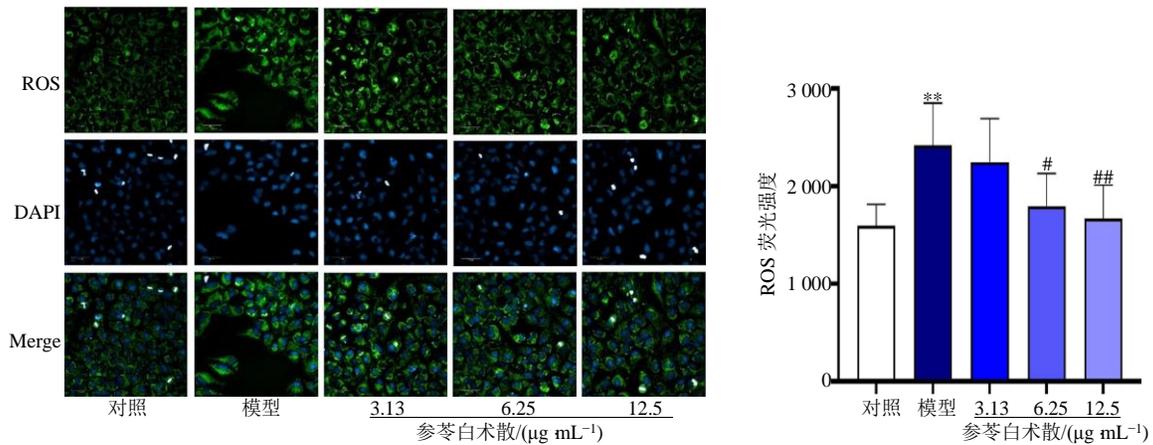
与对照组比较,模型组 GES-1 细胞核、细胞质



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 3 参苓白术散对脂多糖诱导的 GES-1 细胞炎症因子释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect of Shenling Baizhu Powder on the release of inflammatory factors in lipopolysaccharide - induced GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 4 参苓白术散对脂多糖诱导的 GES-1 细胞 ROS 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of Shenling Baizhu Powder on ROS production in lipopolysaccharide - induced GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

NF- κ B p65 荧光强度显著增加,且细胞核 NF- κ B p65 转移比值显著增加 ($P < 0.01$),说明在脂多糖刺激下,可以促进 GES-1 细胞 NF- κ B p65 转位入核;与模型组相比,参苓白术散可以显著抑制细胞 NF- κ B p65 核位移 ($P < 0.05$),见图 6。

2.6 参苓白术散对 GES-1 细胞凋亡的影响

与对照组比较,模型组 GES-1 细胞绿色荧光强度显著增加 ($P < 0.01$);与模型组相比,参苓白术散 12.5 μ g/mL 组 Caspase 3/7 绿色荧光强度显著降低 ($P < 0.05$),见图 7。

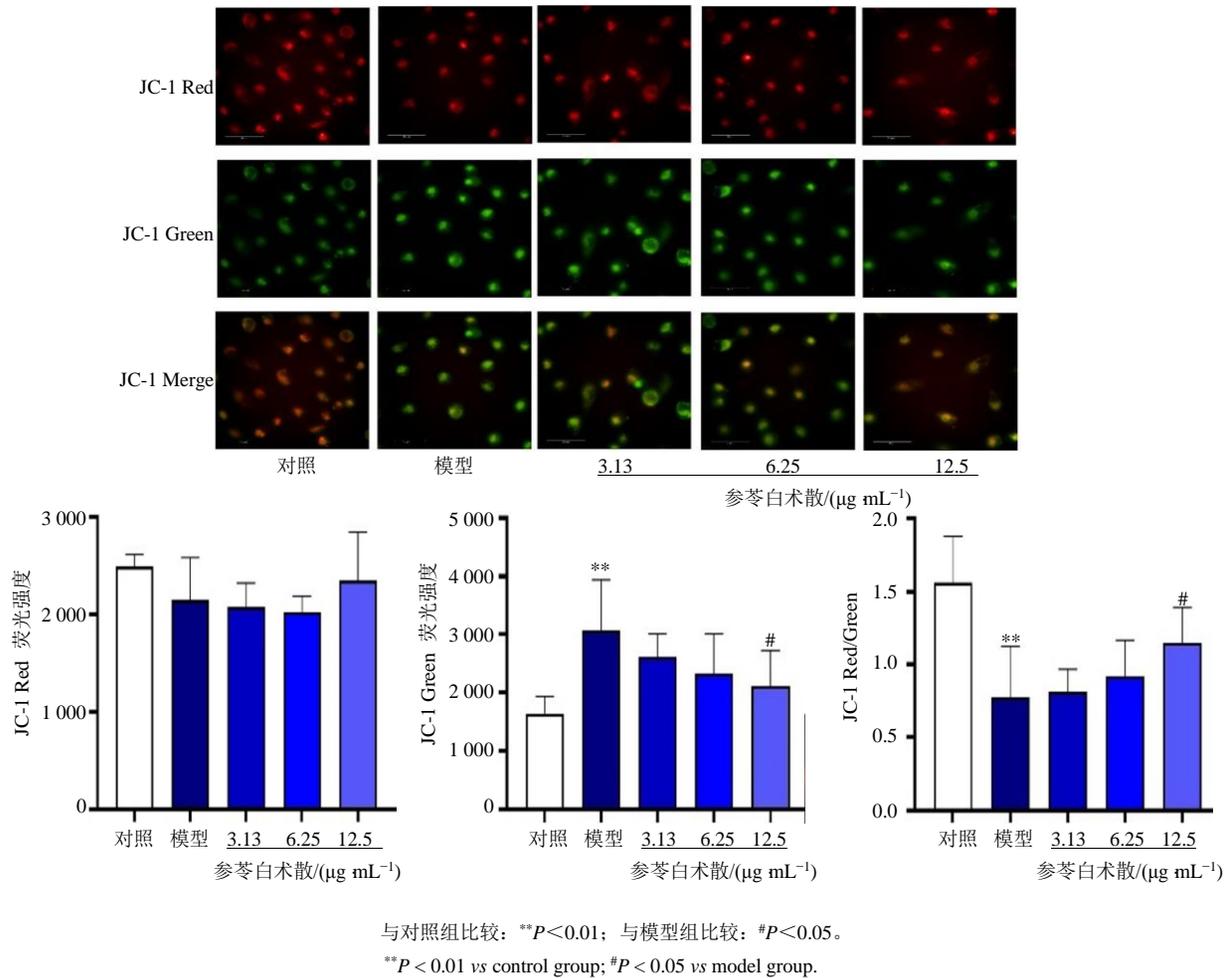
2.7 参苓白术散对 GES-1 细胞 TLR4 和 Nrf2 蛋白及 mRNA 表达的影响

与对照组比较,模型组 GES-1 细胞 TLR4 蛋白

和 mRNA 相对表达量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比,参苓白术散 12.5 μ g/mL 组细胞 TLR4 蛋白相对表达量显著降低,而 Nrf2 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$),参苓白术散各剂量组 TLR4 mRNA 相对表达量均显著降低 ($P < 0.01$),参苓白术散 6.25、12.5 μ g/mL 组 Nrf2 mRNA 相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01),见图 8。

2.8 参苓白术散对 GES-1 细胞自噬小体的影响

结果显示,对照组细胞线粒体未见明显肿胀,膜完整,膜内基质均匀,嵴可见,可见较多自噬溶酶体和自噬小体。与对照组相比,模型组细胞线粒体轻微肿胀,部分嵴肿胀,嵴少量断裂减少,可见少量自噬溶酶体。与模型组相比,参苓白术散 3.13、

图 5 参苓白术散对 GES-1 细胞的线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 5 Effect of Shenling Baizhu Powder on mitochondrial membrane potential of GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

6.25 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞线粒体轻微肿胀, 嵴少量断裂减少, 可见少量自噬溶酶体; 参苓白术散 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞线粒体轻微肿胀, 嵴少量断裂减少, 可见较多自噬溶酶体和自噬小体。各组粗面内质网未见明显扩张。透射电镜结果表明参苓白术散能够提高脂多糖环境下 GES-1 细胞内自噬小体的数量, 见图 9。

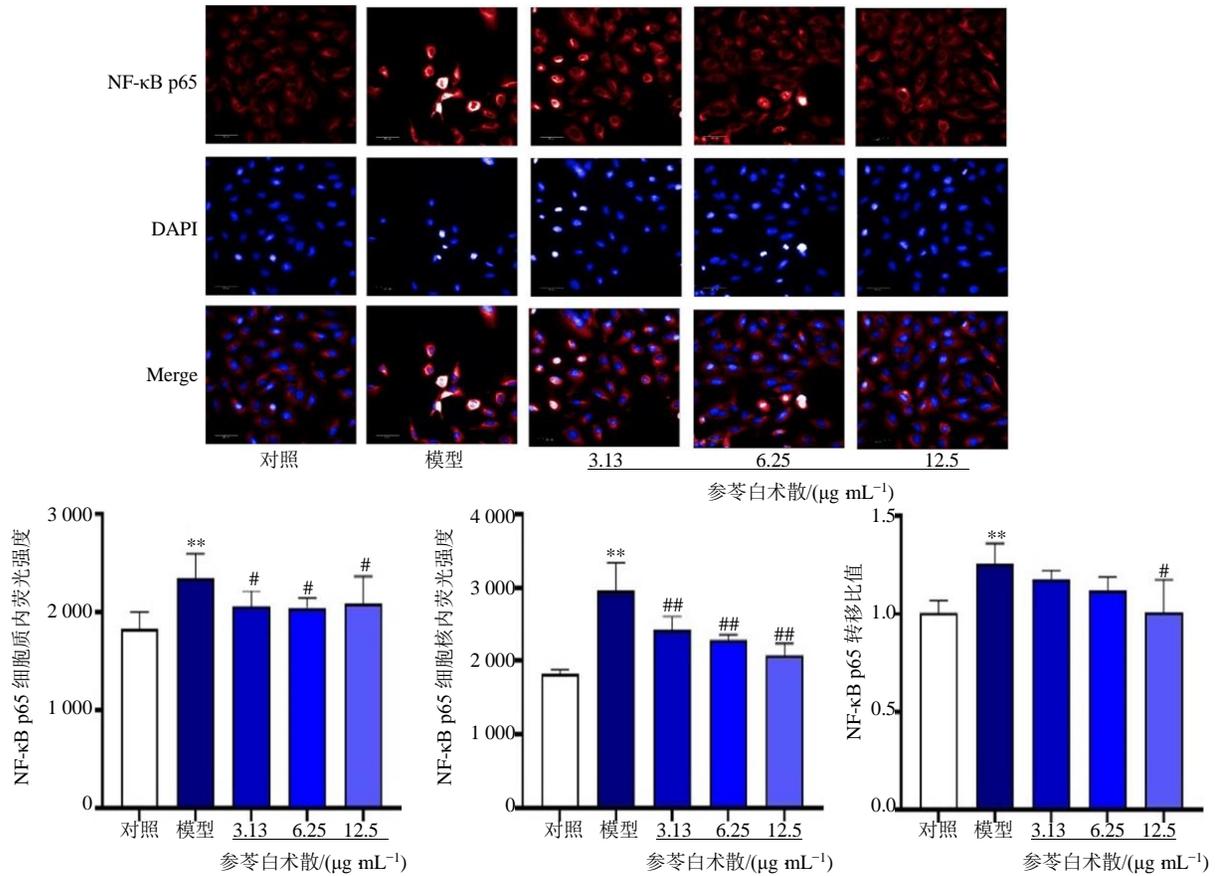
2.9 参苓白术散对 GES-1 细胞 LC3II 和 p62 蛋白表达的影响

如图 10 所示, 与对照组相比, 模型组 GES-1 细胞内自噬蛋白 LC3II 表达显著降低, p62 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 参苓白术散 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞内 LC3II 表达显著升高, p62 表达显著降低 ($P < 0.05$), 表明参苓白术散可增加 LC3II 表达, 减少 p62 表达, 并上调脂多糖诱导的细胞自噬水平。

3 讨论

Hp 是一种微需氧的革兰阴性菌, 可自然定植于

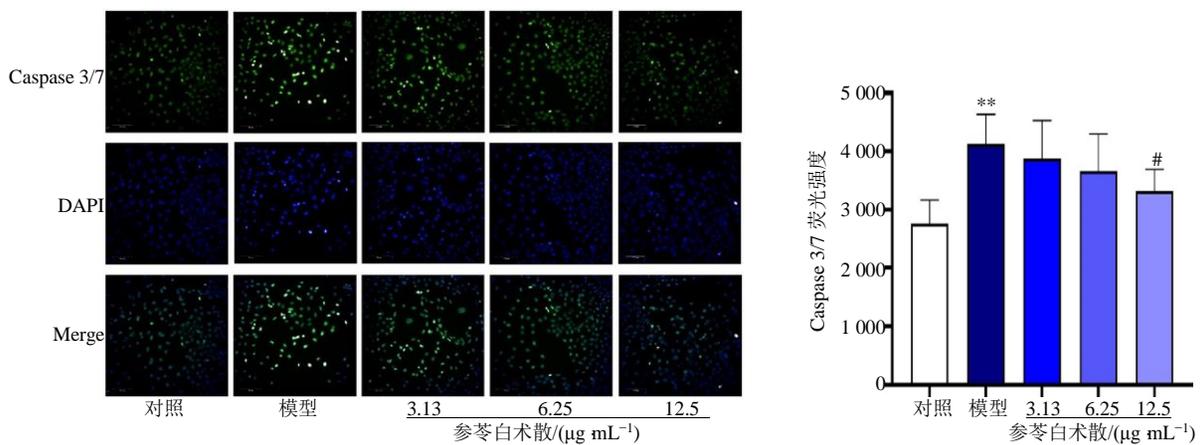
人类胃黏膜, 是目前所知能够在胃内高酸性条件下生存的唯一微生物种类。Hp 感染与十二指肠溃疡, 胃癌等多种胃肠道疾病密切相关。Hp 及其产物脂多糖是炎症的强大诱导剂, 暴露于 Hp 脂多糖会导致胃黏膜 NO 和促炎细胞因子水平显著升高^[11]。NO 是炎症反应的重要调节分子, 少量 NO 在炎症早期可以清除病原体, 为机体提供保护措施, 但过量的 NO 释放会与超氧阴离子反应产生过氧亚硝酸盐, 导致 DNA 破坏, 低密度脂蛋白 (LDL) 氧化并使其酪氨酸发生硝化作用, 引起局部组织损伤, 进一步加重炎症^[12]。脂多糖主要通过 TLRs 受体激活 NF- κ B 信号通路, 使 NF- κ B 转位入核并调控相关细胞因子和趋化因子的基因表达^[13]。NF- κ B 位于 TLR4 信号通路的下游, 可介导多种炎症过程。TLR4 可以招募下游信号分子髓样分化因子 88 (MyD88), 促进 NF- κ B 入核, 诱导 IL-1 β 、TNF- α 、一氧化氮合酶等炎性介质的释放^[14-16]。TLR4/NF- κ B 通路是炎



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 6 参苓白术散对 GES-1 细胞 NF-κB p65 核转位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of Shenling Baizhu Powder on NF-κB p65 nuclear translocation in GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 7 参苓白术散对 GES-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effect of Shenling Baizhu Powder on apoptosis of GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

症反应过程中的关键信号通路。本研究结果表明, 模型组 GES-1 细胞 NO 释放显著增加, 炎症因子

TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平明显升高, 促进了细胞 NF-κB 核转位, 并导致细胞 TLR4 蛋白和基因表达

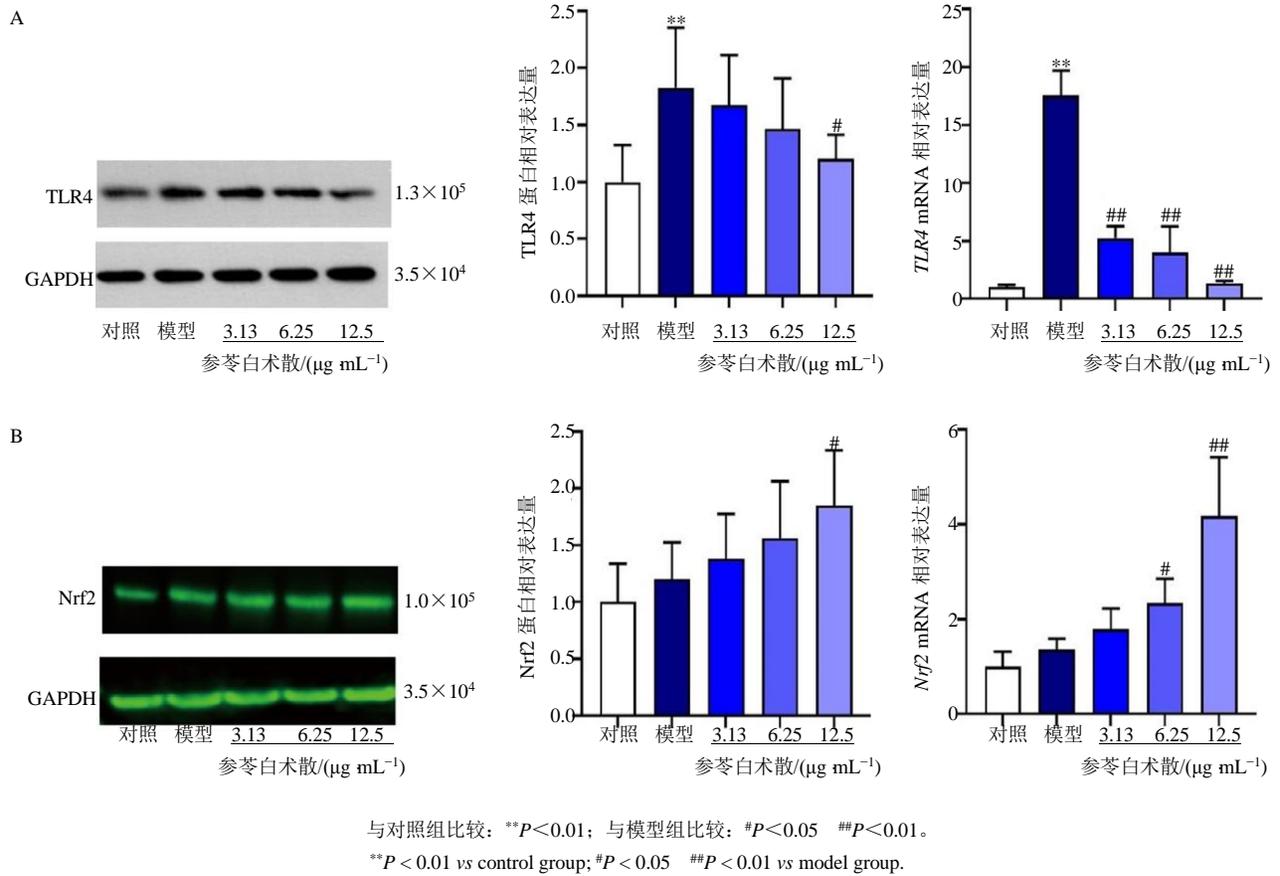
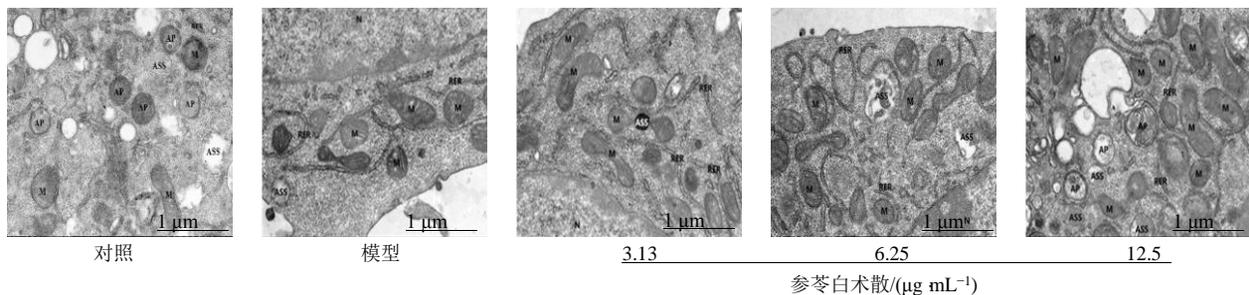


图 8 参苓白术散对 GES-1 细胞 TLR4 (A) 和 Nrf2 (B) 蛋白及 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 8 Effects of Shenling Baizhu Powder on TLR4 (A) and Nrf2 (B) protein expression and mRNA in GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)



ASS: 自噬溶酶体; M: 线粒体; RER: 粗面内质网; AP: 自噬小体; N: 细胞核。
ASS: autolysosome; M: mitochondria; RER: rough endoplasmic reticulum; AP: autophagosome; N: nucleus.

图 9 参苓白术散对 GES-1 细胞内自噬小体的影响 (透射电镜, $\times 15000$)
Fig. 9 Effect of Shenling Baizhu Powder on autophagosomes in GES-1 cells (TEM, $\times 15000$)

水平升高。参苓白术散组可以显著抑制细胞 NO 释放,降低细胞上清炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌,抑制 GES-1 细胞 NF- κ B 核转位,降低细胞 TLR4 蛋白和基因表达,说明参苓白术散可能通过调节细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用。ROS 通过 NF- κ B 等转录因子,进一步促进炎症细胞因子的上调,从而导致组织损伤。当氧化应激发

生时,细胞内 ROS 积累而导致机体抗氧化系统失衡,大量的 ROS 会使细胞线粒体膜的通透性发生改变、线粒体通透转运孔道 (mPTP) 过度开放、线粒体膜电位降低、线粒体功能发生异常,并诱使炎症因子释放,发生炎症反应,最终导致细胞凋亡^[17-18]。已有文献研究表明,脂多糖可以通过 NF- κ B 信号通路诱导 ROS 过量产生,从而导致细胞凋亡^[19-21]。

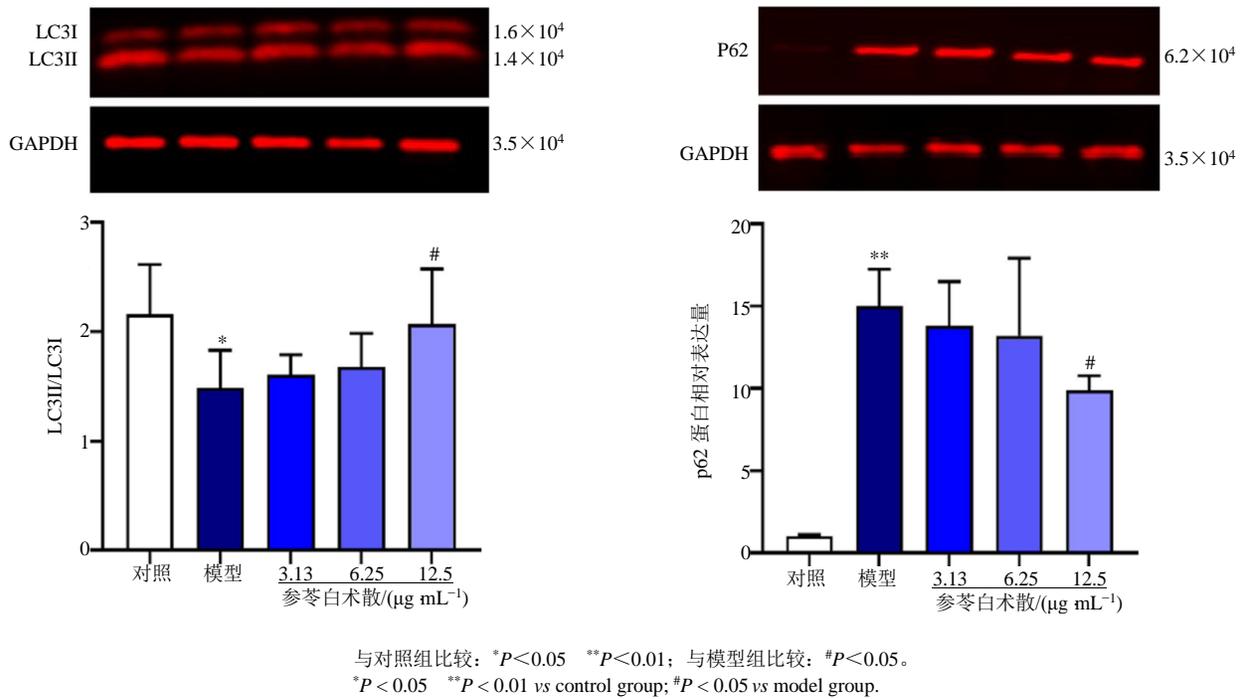


图 10 参苓白术散对 GES-1 细胞中 LC3II、p62 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 10 Effect of Shenling Baizhu Powder on the expression of LC3II, p62 protein in GES-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Nrf2 信号通路是机体抵御氧化应激的重要通路,在静态条件下,Nrf2 主要存在于细胞质中处于非活性状态,受到外来刺激后 Nrf2 转运至细胞核中与抗氧化反应元件(ARE)结合,促进下游多种抗氧化酶和 II 相解毒酶基因的表达,进而增强细胞的抗氧化能力^[22-24]。本研究结果显示,脂多糖处理后,GES-1 细胞内 ROS 生成显著性增加,线粒体膜电位显著性下降,细胞内 Caspase 3/7 染色显著性升高,提示脂多糖可以诱导细胞氧化应激和凋亡。结果还发现,细胞 Nrf2 有较低程度的激活,这可能是细胞对脂多糖损伤的适应性反应。参苓白术散给药后可以显著抑制细胞 ROS 生成,升高细胞线粒体膜电位,抑制细胞凋亡,并且在蛋白和 mRNA 水平有效激活 Nrf2 表达,这可能是参苓白术散对脂多糖诱导 GES-1 细胞氧化损伤的作用机制。

自噬是存在于真核细胞内的一种自我保护机制。自噬通过消除细胞中受损、衰老的大分子物质及细胞器,降解促炎信号分子,调节炎症细胞因子的产生和释放,从而减少促炎信号的传导^[25]。自噬也可以控制感染的传播,细胞质中的游离微生物或被吞噬体包裹的微生物可以被捕获,并最终由自噬体传递给溶酶体降解^[26]。自噬小体内外膜上的 LC3 蛋白在自噬发生中起了重要的作用。自噬发生时,LC3 的细胞质形式 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺结合形成

LC3-磷脂酰乙醇胺结合物 LC3-II,后者被募集到自噬体膜。自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,而自噬体内的成分则被溶酶体水解酶降解^[27]。p62 是自噬的经典受体,遍布于组织和细胞中,参与许多信号转导途径,包括 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Keap1)/Nrf2 途径^[28]。当自噬被激活,自噬接头蛋白 p62 可识别泛素化底物并传递到自噬小体降解^[29]。实验结果显示,脂多糖处理 GES-1 细胞后,细胞自噬溶酶体和自噬小体数量显著性下降,LC3II 蛋白表达显著性降低,p62 蛋白表达显著性升高;参苓白术散能够诱导 GES-1 细胞自噬相关蛋白 LC3 II 表达增加,促进 p62 降解,提高脂多糖环境下 GES-1 细胞的自噬小体数量,诱导细胞自噬,表明参苓白术散可能通过自噬机制保护细胞炎症损伤。

综上所述,本实验在体外研究了参苓白术散对脂多糖诱导的人胃黏膜上皮细胞模型炎症反应的影响,并探索了相关作用机制。研究结果表明参苓白术散可降低脂多糖刺激下人胃黏膜上皮细胞炎症介质的表达,减少细胞 ROS 生成和细胞凋亡,调节 TLR4/NF- κ B/Nrf2 信号通路和促进细胞自噬可能是参苓白术散抗炎的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Wang F, Meng W B, Wang B Y, et al. *Helicobacter pylori*-

- induced gastric inflammation and gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(2): 196-202.
- [2] Sonnenberg A, Lash R H, Genta R M. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6): 1894-1901.
- [3] Liu W Z. Interpretation of the fifth Chinese national consensus report on management of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Chin J Gastroenterol*, 2017, 22(6): 321-324.
- [4] 刘倩, 胡晶, 李博, 等. 荆花胃康胶丸联合四联疗法治疗幽门螺旋杆菌相关性胃炎的系统评价及Meta分析[J]. *中国药物警戒*, 2023, 20(9): 1039-1045.
- [5] Ramakrishna Y G, Savithri K, Kist M, et al. Aegle marmelos fruit extract attenuates *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induced oxidative stress in Sprague Dawley rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 19: 375.
- [6] 周红祖, 黎莹斯, 陈永恒, 等. 左金方对幽门螺旋杆菌感染的人 GES-1 细胞增殖与凋亡的作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(4): 880-887.
- [7] 何峰, 覃岭, 温祥臣. 虎杖苷对幽门螺旋杆菌脂多糖诱导的胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞凋亡及 TNF- α 水平影响 [J]. *环球中医药*, 2018, 11(9): 1347-1351.
- [8] Tian J L, Si X, Wang Y, et al. Cyanidin-3-*O*-glucoside protects human gastric epithelial cells against *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-induced disorders by modulating TLR-mediated NF- κ B pathway [J]. *J Funct Foods*, 2020, 68: 103899.
- [9] 董得刚. 参苓白术散加减治疗慢性糜烂性胃炎、胃溃疡伴幽门螺旋杆菌感染心得体会 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(71): 14013.
- [10] 陈凯, 王春. 清胃散合参苓白术散加减治疗慢性胃炎 Hp 感染口苦口臭 46 例 [J]. *浙江中医杂志*, 2022, 57(4): 249-250.
- [11] Xu L, Gong C G, Li G M, et al. Ebselen suppresses inflammation induced by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide via the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6847-6851.
- [12] Xu R Q, Ma L, Chen T, et al. Sophorolipid suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through the NF- κ B signaling pathway [J]. *Molecules*, 2022, 27(15): 5037.
- [13] Chen Y F, Huang J B, Xu C D. Lipopolysaccharide-induced DC-SIGN/TLR4 crosstalk activates NLRP3 inflammasomes via MyD88-independent signaling in gastric epithelial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(1): 112292.
- [14] Thomas L, Rao Z G, Gerstmeier J, et al. Selective upregulation of TNF α expression in classically-activated human monocyte-derived macrophages (M1) through pharmacological interference with V-ATPase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 130: 71-82.
- [15] Youssef N S, Elzaitony A S, Abdel Baky N A. Diacerein attenuate LPS-induced acute lung injury via inhibiting ER stress and apoptosis: Impact on the crosstalk between SphK1/S1P, TLR4/NF κ B/STAT3, and NLRP3/IL-1 β signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2022, 308: 120915.
- [16] Zhu L P, Han J K, Yuan R R, et al. Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 9.
- [17] Sun D Q, Xue A Y, Xue X, et al. Acetylpuerarin protects against OGD-induced cell injury in BV2 microglia by inhibiting HMGB1 release [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(2): 92-97.
- [18] Ha J S, Choi H R, Kim I S, et al. Hypoxia-induced S100A8 expression activates microglial inflammation and promotes neuronal apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1205.
- [19] Miao X S, Cui W. Berberine alleviates LPS-induced apoptosis, oxidation, and skewed lineages during mouse preimplantation development [J]. *Biol Reprod*, 2022, 106(4): 699-709.
- [20] John A, Raza H. Azadirachtin attenuates lipopolysaccharide-induced ROS production, DNA damage, and apoptosis by regulating JNK/Akt and AMPK/mTOR-dependent pathways in Rin-5F pancreatic beta cells [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(12): 1943.
- [21] Chtourou Y, Aouey B, Kebieche M, et al. Protective role of naringin against cisplatin induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in rat striatum via suppressing ROS-mediated NF- κ B and P53 signaling pathways [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 239: 76-86.
- [22] Liu S N, Pi J B, Zhang Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102389.
- [23] Tu W J, Wang H, Li S, et al. The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(3): 637-651.
- [24] Li B T, Wang Y X, Jiang X L, et al. Natural products targeting Nrf2/ARE signaling pathway in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114950.
- [25] Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 243-251.
- [26] Ravanan P, Srikumar I F, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses [J]. *Life Sci*, 2017, 188: 53-67.
- [27] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.
- [28] Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M, et al. p62 links autophagy and Nrf2 signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88(Pt B): 199-204.
- [29] Liu W J, Ye L, Huang W F, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21: 29.