

基于 Akt/NF- κ B 信号通路探讨胃康胶囊对乙醇诱导的大鼠胃溃疡的保护作用机制

汤 瑾^{1,2}, 阮婧华^{1,2}, 苏松柏^{1,2}, 王洪鑫³, 伍天苔^{1,2}, 温 迪^{1,2}, 李 玮², 王建科², 张石宇^{1,2*}

1. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550001

2. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

3. 毕节市七星关区中医妇幼集团医院, 贵州 毕节 551799

摘要: **目的** 基于蛋白激酶 B (Akt)/核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路研究胃康胶囊对乙醇诱导的大鼠胃溃疡的保护作用, 并探索其可能的作用机制。 **方法** SD 大鼠随机分为对照组、模型组、奥美拉唑 (阳性药, 20 mg·kg⁻¹) 组和胃康胶囊低、中、高剂量 (480、960、1 440 mg·kg⁻¹) 组, 每组 6 只。除对照组外, 各组大鼠单次 ig 75%乙醇 (10 mL·kg⁻¹) 造模。造模 1 h 后各给药组 ig 相应药物, 对照组、模型组 ig 等量 0.5% CMC-Na 溶液, 每天 1 次, 连续 3 d, 于第 3 天 ig 6 h 后, 将大鼠麻醉, 腹主动脉采血, 收集血清并分离胃组织。采用改良 Guth 法计算胃溃疡指数和溃疡抑制率; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察大鼠胃组织病理学变化; 过碘酸希夫 (PAS) 染色观察胃组织黏膜糖蛋白表达; 使用试剂盒测定胃组织中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平; TUNEL 染色法比较各组大鼠胃组织细胞凋亡情况; 免疫组化测定胃组织中 Akt/NF- κ B 信号通路蛋白表达水平; Western blotting 分析胃组织中炎症因子及 Akt/NF- κ B 信号通路蛋白表达情况。 **结果** 与模型组相比, 胃康胶囊中、高剂量组的胃黏膜损伤较轻, 出血性损伤明显减少, 仅有少量血点, 胃溃疡指数显著降低、溃疡抑制率显著升高 ($P < 0.01$); 病理学变化明显减轻; 高剂量组大鼠胃组织黏膜层 PAS 染色阳性表达百分比显著升高 ($P < 0.01$); 中、高剂量组 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 各剂量组胃组织细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.01$); 各剂量组胃组织 p-Akt、p-NF- κ B p65 荧光显著减弱 ($P < 0.01$); 中、高剂量组 IL-6、TNF- α 、p-Akt/Akt 和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 胃康胶囊治疗乙醇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, 其作用机制可能与抑制 Akt/NF- κ B 信号通路介导的炎症介质表达及降低氧化应激水平有关。 **关键词:** 胃康胶囊; 乙醇; 胃溃疡; 炎症; 蛋白激酶 B/核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)07-1807-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.011

Exploring protective mechanism of Weikang Capsule against ethanol-induced gastric ulcer in rats based on Akt/NF- κ B signaling pathway

TANG Jin^{1,2}, RUAN Jinghua^{1,2}, SU Songbai^{1,2}, WANG Hongxin³, WU Tiantai^{1,2}, WEN Di^{1,2}, LI Wei², WANG Jianke², ZHANG Shiyu^{1,2}

1. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

2. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

3. Traditional Chinese Medicine Maternity and Children's Group Hospital, Qixingguan District, Bijie 551799, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of gastric capsule against ethanol-induced gastric ulcer (GU) in rats based on the protein kinase B (Akt)/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway, and to explore the possible mechanisms of its action. **Methods** SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the omeprazole (positive drug, 20 mg·kg⁻¹) group, and the low-, medium-, and high-dose (480, 960, and 1 440 mg·kg⁻¹) groups of Weikang Capsules, with six rats in

收稿日期: 2024-11-22

基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划项目 (黔科合基础-ZK [2022] 一般 524); 贵州省中药炮制技术传承基地建设项目 (黔中医药函 (2024) 22 号); 2024 年全国老药工传承工作室建设项目 [黔中医药函 (2024) 42 号]; 贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目 (贵中医 TD 合字 [2023] 005 号)

作者简介: 汤 瑾, 硕士, 主管药师。从事中药民族药新技术与新剂型研究。E-mail: 1007924136@qq.com

*通信作者: 张石宇, 博士, 硕士生导师。从事中药新技术与新制剂、药物代谢研究。E-mail: 442920214@qq.com

each group. Except for the control group, all other groups were given a single ig administration of 75% ethanol (10 mL·kg⁻¹) to establish the model. One hour after modeling, the corresponding drugs were ig administered to the drug groups, while the control group and the model group were given the same volume of 0.5% CMC-Na solution intragastrically once a day for three consecutive days. Six hours after the last intragastric administration on the third day, the rats were anesthetized, and blood was collected from the abdominal aorta. The serum was collected and the gastric tissues were isolated. The gastric ulcer index and ulcer inhibition rate were calculated using the modified Guth method; the histopathological changes of the gastric tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; the expression of mucosal glycoprotein in the gastric tissues was observed by periodic acid-Schiff (PAS) staining; the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in the gastric tissues were determined using kits; the apoptosis of gastric tissue cells was compared by TUNEL staining; the expression levels of Akt/NF- κ B signaling pathway proteins in the gastric tissues were determined by immunohistochemistry; and the expression of inflammatory factors and Akt/NF- κ B signaling pathway proteins in the gastric tissues was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the gastric mucosal damage in the medium- and high-dose Weikang Capsules groups was milder, with significantly reduced hemorrhagic damage and only a few blood spots. The gastric ulcer index was significantly decreased and the ulcer inhibition rate was significantly increased ($P < 0.01$). The pathological changes were significantly alleviated. The percentage of PAS staining positive expression in the gastric mucosal layer of the high-dose group was significantly increased ($P < 0.01$). The SOD activity in the medium- and high-dose groups was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), and the MDA level was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The apoptosis rate of gastric tissue cells in all dose groups was significantly decreased ($P < 0.01$). The fluorescence of p-Akt and p-NF- κ B p65 in the gastric tissues of each dose group was significantly weakened ($P < 0.01$). The protein expressions of IL-6, TNF- α , p-Akt/Akt, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 in the medium- and high-dose groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The effect of Weikang Capsule in treating ethanol-induced gastric ulcer model rats was remarkable, which could effectively reduce the ulcer area, increase the ulcer inhibition rate and protect the ulcer tissue. The mechanism of action may be related to the inhibition of Akt/NF- κ B signaling pathway-mediated expression of inflammatory mediators and the reduction of oxidative stress.

Key words: Weikang Capsule; ethanol; gastric ulcer; inflammatory; protein kinase B/nuclear transcription factor- κ B

胃溃疡是消化系统常见病之一，其病灶位于贲门与幽门之间，属于慢性胃肠黏膜层溃疡性炎症^[1]，多由幽门螺杆菌（*helicobacter pylori*, Hp）感染所致，可造成胃黏膜缺损，同时累及黏膜、黏膜下层及肌层，引发上腹部疼痛等症状，严重时可导致出血、穿孔等临床急性症状^[2]，发病率占总人口的10%~12%，其癌变率为6.5%~7.5%^[3]。作为全球性多发性疾病，胃溃疡因高发病率、高复发率且具有癌变可能性而备受关注，胃溃疡已成为临床常见且十分危险的消化系统疾病之一。

中医药作为我国传统医学代表，其在消化道疾病治疗领域具有丰富经验，可针对患者病症特点辨证施治，在症状缓解、溃疡愈合、用药安全及预后复发等方面均具有显著优势^[4-6]。胃康胶囊是贵州中医药大学第一附属医院消化科科室专家经过长期的临床积累，通过中医中药辨证组合，用于舒肝健脾、理气活血止痛的中药复方制剂，已获得贵州省食品药品监督管理局制剂批准文号（黔药制字Z20030030），方由柴胡、党参、白芍、佛手、延胡索、川楝子、丹参、茯苓、陈皮、甘草、木香、白术（土炒）组成，用于治疗慢性胃炎、消化性溃疡

20余年，疗效明确^[7]。方中多种中药及其药效部位具有抗胃溃疡的作用，柴胡皂苷具有保护胃黏膜的作用^[8]；党参提取物具有治疗胃溃疡、促进肠道推进、提高机体消化能力等药理作用^[9]；白芍中的白芍总苷能够改善慢性萎缩性胃炎大鼠黏膜血流量，提高胃动力，减轻胃黏膜损伤^[10]；木香的提取物和挥发油对消化系统的药效主要体现为促进胃肠运动、止泻、保护胃黏膜、抗溃疡和利胆等作用^[11]；甘草的主要活性成分甘草次酸、甘草黄酮能促进胃黏膜黏液的分泌，提高胃黏膜防御能力^[12]；白术中的内酯化合物和挥发油具有调节胃肠运动、抑制炎症反应等作用^[13]。本研究基于氧化应激及蛋白激酶B（Akt）/核转录因子- κ B（NF- κ B）信号通路介导的炎症反应探讨胃康胶囊对乙醇诱导的胃溃疡大鼠胃黏膜组织的保护作用及机制，旨在丰富胃康胶囊根治疗胃溃疡理论基础，并为该制剂的临床应用及进一步研究提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠48只，体质量（220±20）g，雄性，购自长沙市天勤生物技术有限公司，实验动

物生产许可证号为 SCXK(湘)2022-0011。本研究动物实验方案通过贵州中医药大学动物伦理委员会的审查(编号 20230190),研究中的动物实验严格按照批准的研究方案开展。大鼠饲养于通风良好,温度 20~25 ℃、湿度 50%~60%环境下,并进行 12 h 明暗循环,按每笼 6 只分装,由专人饲养管理,自由饮水及饲料,实验操作和处理严格遵循国际准则。

1.2 药物

胃康胶囊(批号 230802)由贵州中医药大学第一附属医院制剂生产中心提供,其制备过程:柴胡、党参、白芍、佛手、延胡索、川楝子、丹参、茯苓、陈皮、甘草、木香、白术共 1 148 g,经粉碎、提取等工艺,灭菌,装入胶囊,制成 1 000 粒,每粒装 0.39 g。内容物为黄棕色的粉末,味微苦,依据胃康胶囊质量标准及《中国药典》2020 年版四部通则胶囊剂项下进行相应检查,薄层鉴别应检出延胡索,水分不得过 9.0%,崩解时限不超过 30 min,微生物限度检查应符合规定。奥美拉唑(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 12102371,质量分数 98%)。

1.3 主要试剂

总蛋白(TP)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒(货号分别为 A045-2-1、A001-1-1、A003-1-1,南京建成生物工程研究所);TUNEL 试剂盒(货号 1168479590,罗氏公司);一抗: β -actin(货号 AC026, Abclonal 公司),蛋白激酶 B(Akt, 货号 A17909, Abclonal 公司),白细胞介素(IL-6, 货号 DF6087, Affbiotech 公司),核因子 κ B(NF- κ B) p65(货号 AF5006, Affbiotech 公司),肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 货号 BA0131, Boster 公司),p-Akt(货号 bs-2720R, Bioss 公司),p-NF- κ B p65(货号 310013, Zen-bio 公司);二抗(FITC 标记山羊抗兔)(货号 GB22303, Servicebio 公司),二抗(CY3 标记山羊抗小鼠)(货号 GB21301, Servicebio 公司);DAPI 染色试剂(货号 G1012, 赛维尔生物科技有限公司);牛血清(BSA, 货号 GC305010, 赛维尔生物科技有限公司);中性树胶(货号 BL704A, Biosharp 生物公司);苏木素染液(货号 G1004, 赛维尔生物科技有限公司);伊红染液(货号 YE2080, 合肥博美生物科技有限责任公司);过碘酸希夫(PAS)染色液(货号 G1280, 赛维尔生物技术有限责任公司);磷

酸盐缓冲液(PBS, 货号 ZLI-9062, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.4 主要仪器

徕卡-2016 型转轮式切片机(德国徕卡公司);JT-12S 型自动脱水机(武汉俊杰电子有限公司);BMJ-A 型组织包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);PHY-III 型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司);Pannoramic 250 型数字切片扫描仪(3DHISTECH 公司);BA210Digital 型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);BMJ-A 型冷冻台(常州市中盛电子仪器有限公司);HY-5 型脱色摇床(上海程捷仪器设备有限公司);XK80-A 型漩涡混匀仪(江苏新康医疗器械有限公司);SpectraMAX Plus384 型酶标仪(美谷分子仪器有限公司);KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);FA2004 型电子天平(力辰科技有限公司);SSY-II 型纯水机(四川水思源环境科技有限公司);H2050R 型台式高速冷冻离心机(湘仪集团);A80400011 型修复仪(Thermo Shandon Limited);KZ-III-F 型低温高速组织研磨仪(Servicebio 公司);5200 Multi 型荧光图像分析系统(Tanon 公司)。

2 方法

2.1 分组、给药、造模与取材

SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机将其分为对照组、模型组、奥美拉唑(阳性药, 20 mg·kg⁻¹)组和胃康胶囊低、中、高剂量(480、960、1 440 mg·kg⁻¹)组,每组 6 只。除对照组外,各组大鼠禁食 24 h,禁水 12 h,单次 ig 75%乙醇(10 mL·kg⁻¹)造模^[14]。造模 1 h 后,各给药组 ig 相应药物,对照组、模型组 ig 等量 0.5% CMC-Na 溶液,每天 1 次,连续 3 d,于第 3 天 ig 给药 6 h 后,将大鼠麻醉,腹主动脉采血,室温放置 1 h,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液,转移至-80 ℃冰箱中保存,备用;取出胃组织,沿胃大弯剪开,用预冷的 0.9%氯化钠溶液冲洗胃内容物后,滤纸吸干表面水分,在定距相机下记录胃黏膜损伤情况。部分胃组织固定在 10%福尔马林液中,剩余组织迅速置于-80 ℃冰箱中保存备用。

2.2 溃疡指数及溃疡抑制率的测定与计算

通过改良 Guth 法计算各组大鼠胃溃疡指数,胃损伤积分指数:用游标卡尺测出出血点或出血带的长度和宽度,正常胃黏膜为 0 分,长度<1 mm

(包括糜烂点)为 1 分, $1\text{ mm} \leq \text{长度} < 2\text{ mm}$ 为 2 分, $2\text{ mm} \leq \text{长度} < 3\text{ mm}$ 为 3 分, $3 \leq \text{长度} < 4\text{ mm}$ 为 4 分, 长度 $\geq 4\text{ mm}$ 分段测量; 宽度 $> 2\text{ mm}$ 者, 分数乘以 2; 分数之和为损伤总积分。每组所有动物胃溃疡指数之和除以动物数目为该组的平均溃疡指数。

溃疡抑制率 = (模型组溃疡指数 - 各处理组溃疡指数) / 模型组溃疡指数

2.3 胃损伤的组织学评价

固定的大鼠胃组织使用全自动脱水机进行脱水后, 包埋, 切片。取各组切片分别进行苏木精-伊红 (HE) 染色及 PAS 染色, 封片后进行镜检, 采用 Pannoramic 250 数字切片扫描仪对切片进行图像采集, 观察具体病变。

2.4 大鼠胃组织中 MDA 及 SOD 水平的检测

取适量储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱的胃组织, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下解冻, 在冰上将胃组织剪碎, 加入 9 倍量预冷的 0.9% 氯化钠溶液, 匀浆后 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测上清液中的蛋白浓度, 取上清液按照试剂盒说明书检测胃组织中 MDA 及 SOD 水平。

2.5 大鼠胃组织细胞凋亡率的测定与计算

固定大鼠胃组织使用全自动脱水机进行脱水后, 包埋, 切片, 采用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 操作严格按照说明书的指示进行 TUNEL 染色。荧光显微镜下观察凋亡细胞, 采用 Pannoramic 250 数字切片扫描仪进行扫描, 采集图像, 进行凋亡细胞分析, 计算凋亡细胞百分率。

细胞凋亡百分率 = 凋亡细胞 / 细胞总数

2.6 免疫组化测定胃组织中 Akt/NF- κ B 信号通路蛋白表达情况

固定大鼠胃组织使用全自动脱水机进行脱水后, 包埋, 切片, 继而常规脱蜡至水, 室温置于装有 3% 双氧水的染色缸中 10 min , PBS 冲洗 3 次。高温修复抗原后, 室温封闭 20 min , 切片分别滴加稀释好的一抗 p-Akt ($1:100$) 和 p-NF- κ B p65 ($1:100$)。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 滴加二抗兔抗, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温状态下孵育 30 min , 使用 PBS 冲洗 3 次。使用 DAB 显色试剂盒, 混匀后滴加到各个切片上, 并在室温条件下进行显色, 在镜下控制反应的时间。使用蒸馏水充分洗涤切片后, 对其进行苏木素复染, 封片后镜检, 采集切片图像, 并采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的吸

光度 (A) 值和面积, 以平均 A 值分析各靶蛋白的表达情况。

2.7 Western blotting 分析胃组织中炎症因子及 Akt/NF- κ B 信号通路蛋白表达

称取各组大鼠胃黏膜糜烂组织约 0.1 g , 加入适量 RIPA 蛋白裂解液进行匀浆, 以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min , 吸取上清, 加入上样缓冲液后置于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 变性。采用 BCA 蛋白测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。经上样缓冲液孵育后, 通过 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 随后将蛋白转移至硝酸纤维素 (NC) 膜。用含 5% 脱脂奶粉的含 0.05% 聚山梨酯-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 进行封闭, 并加入 IL-6、TNF- α 、AKT、p-Akt、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、 β -actin 抗体在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 PBST 将膜洗涤 3 遍, 加入二抗在室温下孵育 2 h 。用 PBST 将膜洗涤 3 遍, 采用 ECL 进行可视化检测, 使用 Image J 1.8.0 软件进行灰度值检测及分析。

2.8 统计分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 GraphPad Prism 7 统计学软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。数据按 $\alpha=0.05$ 的检验水准。

3 结果

3.1 胃康胶囊对胃溃疡大鼠胃组织的影响

结果如图 1、表 1 所示, 对照组大鼠胃黏膜表面未见明显损伤, 无溃烂、无充血水肿; 与对照组相比, 模型组胃黏膜损伤严重, 有明显暗红色点状、线状、片状出血, 溃疡指数显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠胃黏膜损伤情况均有不同程度的改善, 胃溃疡指数下降, 溃疡抑制率升高, 其中, 奥美拉唑组与胃康胶囊中、高剂量组的胃黏膜损伤较轻, 出血性损伤明显减少, 仅有少量血点, 胃溃疡指数显著降低、溃疡抑制率显著升高 ($P<0.01$)。

3.2 胃康胶囊对胃溃疡大鼠胃组织病理学的影响

结果如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠胃组织黏膜层、黏膜下层、肌层及浆膜部分结构受损; 黏膜上皮及固有层坏死, 坏死区域胃腺结构模糊, 大量壁细胞和主细胞坏死, 细胞崩解, 坏死区域内局部血管充血、出血。与模型组相比, 奥美拉唑组病变明显减轻, 胃组织结构完整、清晰, 分层明显, 黏膜下层、肌层和外膜连接紧密; 胃康胶囊中剂量组胃组织结构轻微受损, 黏膜层浅表变性坏死, 壁细胞形态结构模糊; 胃康胶囊高剂量组病变

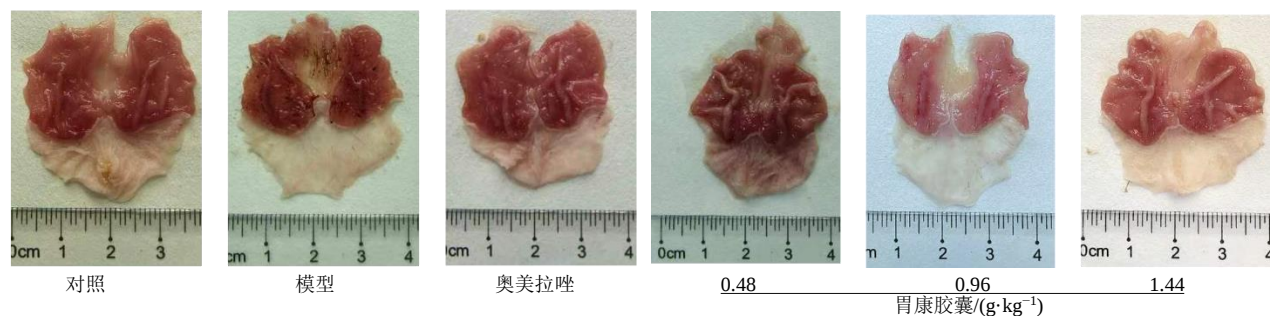


图 1 胃康胶囊对乙醇诱导大鼠胃溃疡模型胃组织形态学的影响

Fig. 1 Results of Weikang Capsule on gastric morphology in ethanol-induced gastric ulcer model in rats

表 1 大鼠胃溃疡指数与溃疡抑制率结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 1 Results of gastric ulcer index and ulcer inhibition rate determination in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	溃疡指数	溃疡抑制率/%
对照	—	—	—
模型	—	$34.95 \pm 35.52^{##}$	—
奥美拉唑	20	$4.78 \pm 1.62^{**}$	$86.33 \pm 4.63^{**}$
胃康胶囊	480	21.11 ± 15.70	39.59 ± 44.92
	960	$13.45 \pm 4.24^{**}$	$61.53 \pm 12.13^{**}$
	1 440	$7.72 \pm 2.31^{**}$	$77.90 \pm 6.62^{**}$

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

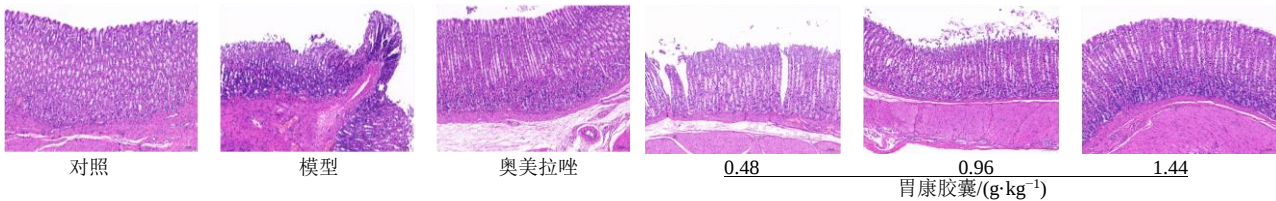


图 2 各组大鼠胃组织病理形态变化 (HE 染色, $\times 100$)

Fig. 2 Pathological morphological changes of gastric tissues in each group of rats (HE, $\times 100$)

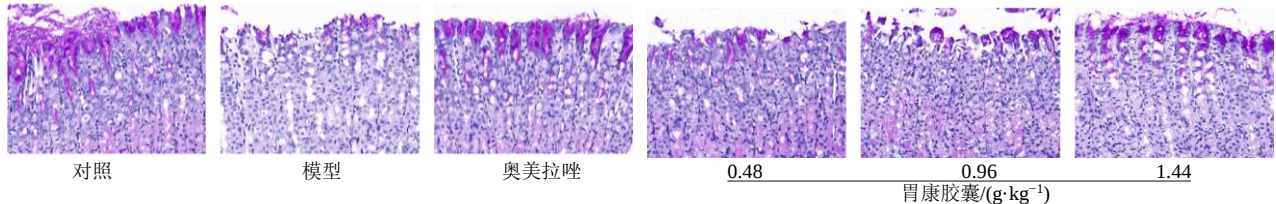


图 3 胃康胶囊对乙醇诱导大鼠胃溃疡模型胃组织 PAS 染色结果 ($\times 400$)

Fig. 3 Results of PAS staining of gastric tissues in rat gastric ulcer models induced by ethanol by Weikang Capsule ($\times 400$)

学意义。

3.4 胃康胶囊对胃溃疡大鼠胃组织中 SOD、MDA 水平的影响

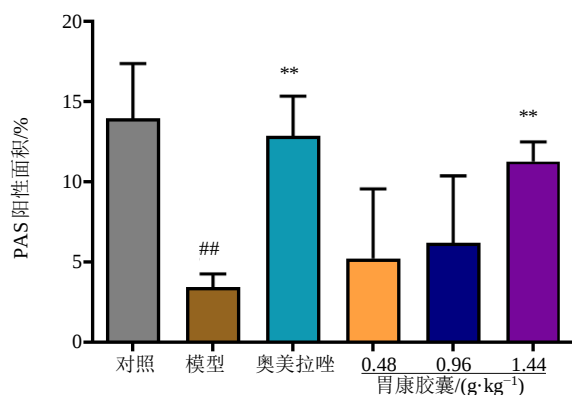
结果如图 5, 与对照组相比, 模型组 SOD 活性

较轻, 胃组织结构完整、清晰, 分层明显。

3.3 胃康胶囊对胃溃疡大鼠胃组织黏膜糖蛋白表达的影响

黏液中的酸性黏液多糖是胃上皮细胞重要的保护层, 采用 PAS 染色法检测胃黏膜细胞表面酸性黏多糖的含量, 即紫色斑点的数量。结果如图 3、4 所示, 对照组大鼠胃组织黏膜层的 PAS 染色呈现出了完整的阳性; 模型组大鼠胃组织黏膜层上皮严重受损, PAS 阳性物消失不见, 黏蛋白受到严重损伤, 其阳性表达百分比显著降低 ($P<0.01$); 与模型组相比, 奥美拉唑组、胃康胶囊高剂量组大鼠胃组织黏膜层 PAS 染色阳性表达百分比显著升高 ($P<0.01$); 胃康胶囊低、中剂量组略有升高, 但无统计

显著降低 ($P<0.01$), MDA 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 胃康胶囊中、高剂量组 SOD 活性显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), MDA 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

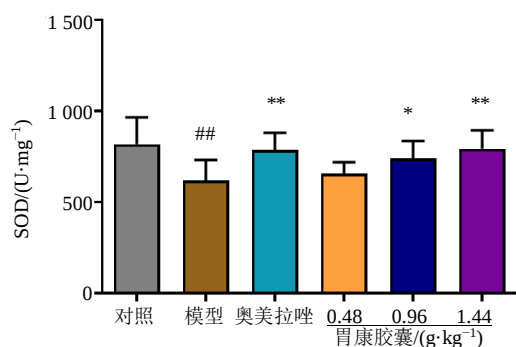


与对照组比较: ## $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ 。

$P<0.01$ vs control group; ** $P<0.01$ vs model group.

图 4 PAS 染色阳性表达百分比 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Positive expression percentage of PAS staining ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

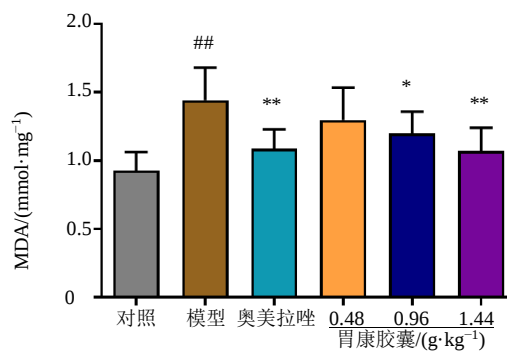


3.5 胃康胶囊对胃溃疡模型大鼠胃组织细胞凋亡的影响

在荧光显微镜下可以观察到, 正常细胞核呈蓝光, 凋亡细胞核呈绿光。由图 6、7 可知, 与对照组相比, 模型组大鼠胃组织细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 奥美拉唑组、胃康胶囊各剂量组胃组织细胞凋亡率显著降低 ($P<0.01$)。

3.6 胃康胶囊对胃溃疡模型大鼠胃组织细胞中 p-Akt 与 p-NF- κ B p65 表达的影响

结果如图 8, 与对照组比较, 模型组大鼠胃组织细胞中 p-Akt 与 p-NF- κ B p65 荧光显著增强 ($P<0.01$); 与模型组比较, 奥美拉唑组和胃康胶囊各剂量组胃组织细胞中 p-Akt、p-NF- κ B p65 荧光显著减弱 ($P<0.01$)。



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; ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs model group.

图 5 胃康胶囊对大鼠胃组织中 SOD、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Results of Weikang Capsule on expression levels of SOD and MDA in gastric tissues of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

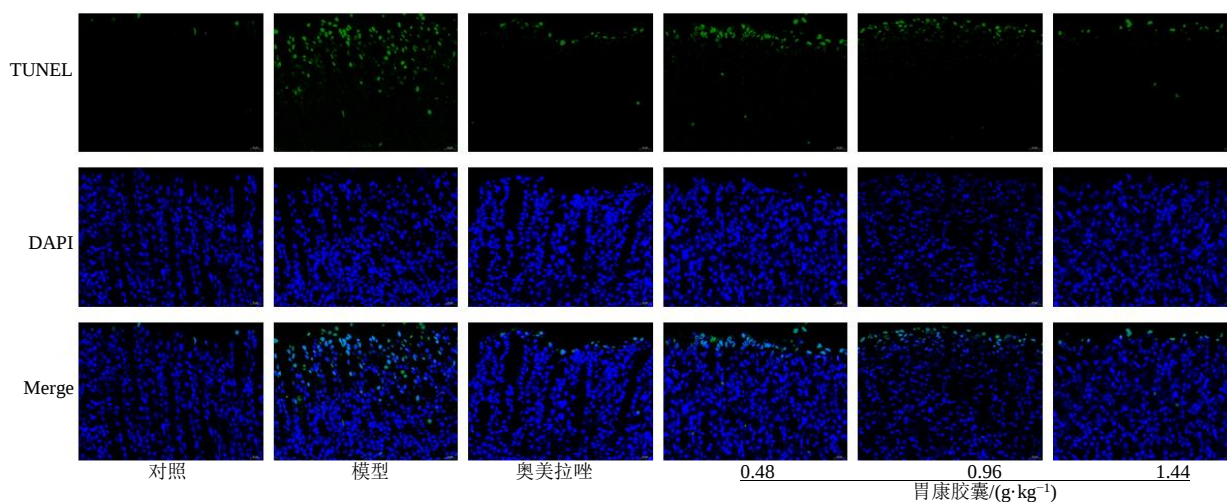
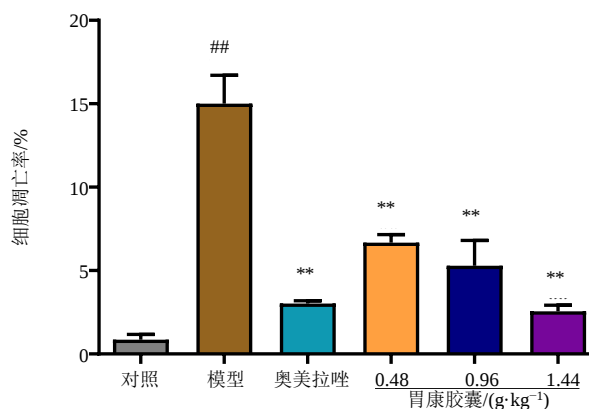


图 6 各组大鼠胃组织细胞 TUNEL 染色 ($\times 400$)

Fig. 6 TUNEL staining of gastric tissue cells in each group ($\times 400$)

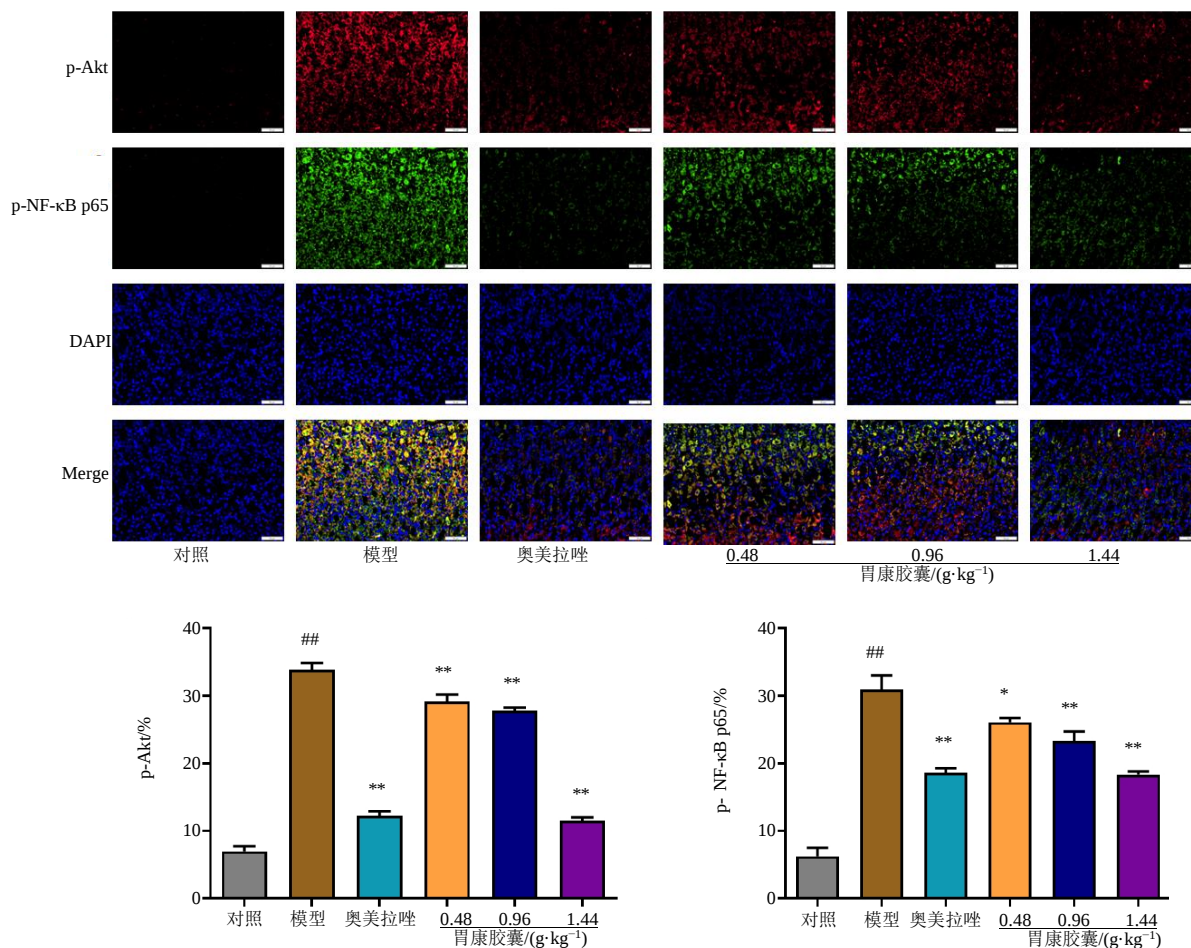


与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$ 。

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group.

图 7 各组大鼠胃组织细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 7 Percentage of apoptosis in gastric tissue cells of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



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 8 胃康胶囊对胃溃疡模型大鼠胃组织细胞中 p-Akt 与 p-NF-κB p65 表达的影响 (免疫荧光, $\times 400$) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 8 Results of Weikang Capsule on expression of p-Akt and p-NF-κB p65 in gastric tissue cells of gastric ulcer model rats (immunofluorescence, $\times 400$) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.7 胃康胶囊对胃溃疡模型大鼠胃组织细胞中 Akt/NF-κB 通路蛋白表达的影响

Western blotting 结果如图 9 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠胃组织中 IL-6、TNF- α 、p-Akt/Akt 和 p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 奥美拉唑组和胃康胶囊中、高剂量组 IL-6、TNF- α 、p-Akt/Akt 和 p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

西医对胃溃疡的治疗主要集中于抑制胃酸、提高胃黏膜保护能力、针对 Hp 感染进行根除, 以及心理干预、饮食建议等辅助疗法。然而胃溃疡具反复发作、迁延难愈的特点, 若经过 12 周的正规治疗后溃疡仍难以愈合, 可称为难治性胃溃疡。此外因抗生素的长期应用, 导致患者耐药性的产生, 对 Hp

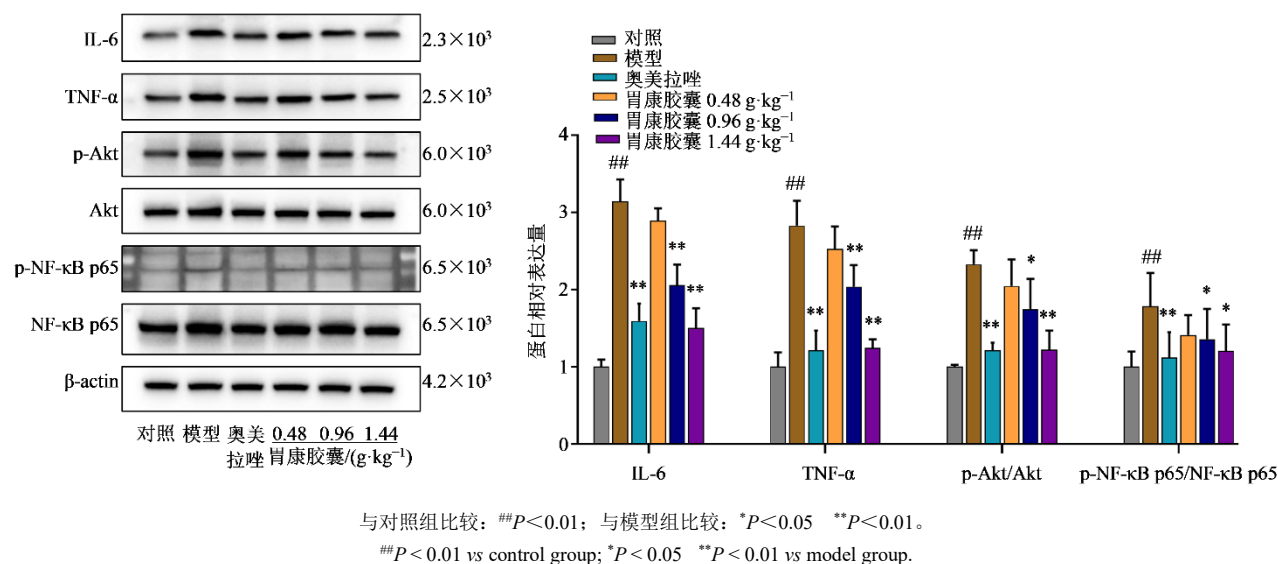


图 9 胃康胶囊对胃溃疡模型大鼠胃组织细胞中 Akt/NF-κB 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Results of Weikang Capsule on protein expression of Akt/NF-κB pathway in gastric tissue cells of gastric ulcer model rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

的根除率下降,继而致使胃溃疡的加重,亦可发展为难治性胃溃疡。常规的西医治疗途径对难治性胃溃疡往往无法取得理想的疗效,而抑酸剂等药物的不良反应及局限性,亦促使了对治疗胃溃疡新途径、新药物研发的需求。

中医并无胃溃疡这一病名,依据其病症表现可归属于“胃脘痛”“痞满”“嘈杂”“反酸”等范畴^[15],中医药通过多靶点、多角度、多途径治疗胃溃疡,已被证实具有疗效显著、不良反应小且复发率低等优势^[16]。辨证论治是中医治疗疾病的基础,根据临床症状,胃溃疡中医辨证分型主要包括肝胃不和证、肝胃郁热证、脾胃虚弱证、脾胃湿热证、胃阴不足证以及胃络瘀阻证。

胃康胶囊常用于治疗胃溃疡等病,该制剂经过长期的临床应用,疗效显著。本病基本病机为脾虚气滞、湿阻中焦,治疗当以健脾行气,化湿止痛为原则。根据此治疗原则,本研究选取长期广泛用于临床、疗效确切的胃康胶囊为研究对象,探讨该方治疗胃溃疡的作用及机制。

乙醇引起的胃溃疡是一种常见情况,过量摄入乙醇导致胃黏膜受损,进而导致胃黏膜毛细血管内皮细胞凋亡,造成胃腔内出血,加重组织缺血程度。这会影胃黏膜正常的代谢和功能,减弱其抗损伤和修复能力。同时,乙醇也可直接损伤胃黏膜细胞,促进胃酸分泌,从而加重胃黏膜损伤,导致胃溃疡的发生^[17-18]。因此,本研究选择乙醇诱导大鼠胃溃

疡模型。虽然乙醇诱导的胃溃疡病因复杂,但主要原因是氧化应激,它会增加炎症反应。乙醇减少微循环,通过消耗黏液和碳酸氢盐导致胃黏膜缺氧和炎症级联反应的扩散,最终导致细胞坏死和过量活性氧(ROS)生成。在胃黏膜中,抗氧化酶介导 ROS 生成和抗氧化防御之间的稳态联系。氧化应激可诱导 MDA 积累和 ROS 过量产生。MDA 是 ROS 过氧化的关键标志物,是脂质氧化的主要终产物,MDA 直接表明 ROS 对胃黏膜的损伤,其产生是由胃损伤介导的^[19-20]。超氧阴离子自由基可以通过抗氧化酶 SOD 消除,SOD 也可以防止自由基的损害^[21]。本研究发现,胃康胶囊减少了乙醇诱导的大鼠胃溃疡指数,提高了胃溃疡抑制率,使 SOD 水平升高,MDA 水平降低,并减少了胃组织细胞的凋亡率。说明胃康胶囊可能通过抑制氧化应激对乙醇诱导的大鼠胃溃疡起保护作用。

胃溃疡是典型的炎症反应。在炎症反应的调控机制中,NF-κB 为介导炎症反应的关键转录因子,其激活后可进一步促进其他细胞因子、趋化因子和生长因子的表达^[22-23]。在胃上皮细胞中,NF-κB 在控制急性炎症反应发作的基因调控中起关键作用^[24]。在正常状态下,NF-κB 保留在细胞质内并与 IκB 蛋白结合^[22]。当机体响应刺激以后,IκBα 蛋白被磷酸化、泛素化和降解,导致 NF-κB 易位进入细胞核,通过结合特定的 DNA 结合位点来对靶基因进行调节和转录^[25]。另一方面,在病理性炎症过程中,单核细

胞、巨噬细胞和淋巴细胞被激活后会被募集到机体的损伤部位进而导致大量 ROS 生成, ROS 会促使 IKK α 磷酸化、I κ B α 蛋白降解, 最终激活 NF- κ B^[26]。此外, NF- κ B 受上游 Akt 的信号调控^[27]。当上游 Akt 接收到刺激后会迅速激活 I κ B α 蛋白激酶, 同时 NF- κ B p65 亚基被迅速激活磷酸化, 继而易位到细胞核中, 从而促使细胞分泌 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎介质, 诱发炎症反应^[28-29], Akt/NF- κ B 通路在调控炎症反应中具有重要作用^[30]。本课题组在前期实验中, 运用网络药理学方法对胃康胶囊抗胃溃疡的通路进行了深入探究, 结果显示 Akt/NF- κ B 通路在胃康胶囊抗胃溃疡机制中占据重要地位。本研究发现, 胃康胶囊中、高剂量显著降低了 IL-6 和 TNF- α 蛋白的表达; 胃康胶囊高、中剂量降低了 p-Akt/Akt 和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的比例, 表明胃康胶囊可通过 Akt/NF- κ B 通路抗乙醇诱导的大鼠胃溃疡。

本研究基于氧化应激及 Akt/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应角度, 通过乙醇诱导的大鼠胃溃疡模型, 证明了胃康胶囊能明显改善由乙醇引起的胃黏膜损伤, 降低细胞凋亡率, 降低 MDA、IL-6 和 TNF- α 的表达水平, 降低 p-Akt/Akt 和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, 升高 SOD 水平。表明胃康胶囊对乙醇诱导的胃溃疡有良好的预防作用, 可有效减少溃疡面积, 增加溃疡抑制率, 保护溃疡组织, 其作用机制可能与抑制 Akt/NF- κ B 信号通路介导的炎症介质表达及降低氧化应激水平有关。本研究在中医辨证论治思想指导下, 阐明胃康胶囊治疗胃溃疡的机制, 为胃康胶囊的现代应用和开发提供参考。同时, 也为胃溃疡的临床治疗提供更多的选择, 为治疗胃溃疡的新药研发提供思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ichida T, Ueyama S, Eto T, et al. Randomized controlled trial comparing the effects of vonoprazan plus rebamipide and esomeprazole plus rebamipide on gastric ulcer healing induced by endoscopic submucosal dissection [J]. Intern Med, 2019, 58(2): 159-166.
- [2] Miyamoto S, Kato M, Matsuda K, et al. Gastric hyperplastic polyps associated with proton pump inhibitor use in a case without a history of *Helicobacter pylori* infection [J]. Intern Med, 2017, 56(14): 1825-1829.
- [3] 李艳琴. 良、恶性胃溃疡 240 例临床病理对照研究 [J]. 吉林医学, 2011, 32(22): 4638-4639.
- [4] Zhao M, Jiang Y C, Chen Z X, et al. Traditional Chinese medicine for *Helicobacter pylori* infection [J]. Medicine, 2021, 100(3): e24282.
- [5] Yang Y, Wang S, Bao Y R, et al. Anti-ulcer effect and potential mechanism of licoflavone by regulating inflammation mediators and amino acid metabolism [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 199: 175-182.
- [6] He Q D, Huang M S, Zhang L B, et al. Effect of moxibustion on intestinal microbiome in acute gastric ulcer rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 6184205.
- [7] 韩秋艳. 胃康胶囊治疗胃脘痛 (肝郁脾虚证) 临床观察及动物实验研究 [D]. 贵州: 贵阳中医学院, 2001.
Han Q Y. Clinical observation and animal experimental study on the treatment of epigastric pain (liver depression and spleen deficiency syndrome) with Weikang capsules [D]. Guizhou: Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, 2001.
- [8] 王海强, 周千瑶, 李冰琪, 等. 柴胡化学成分及药理作用研究进展 [J]. 吉林中医药, 2024, 44(1): 96-100.
Wang H Q, Zhou Q Y, Li B Q, et al. Chemical compositions and pharmacological effects of Chinese thorowax root: Review [J]. Jilin J Chin Med, 2024, 44(1): 96-100.
- [9] 谢琦, 程雪梅, 胡芳弟, 等. 党参化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(8): 94-104.
- [9] Xie Q, Cheng X M, Hu F D, et al. Research advance on chemical constituents, pharmacological action and quality control of *Radix Codonopsis* [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2020, 54(8): 94-104.
- [10] 李学永, 康维娜, 温进平, 等. 白芍总苷对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜的保护作用及机制 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(12): 1638-1644, 1740.
Li X Y, Kang W N, Wen J P, et al. Protective effect and mechanism of total glucosides of paeony on gastric mucosa in rats with chronic atrophic gastritis [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2023, 32(12): 1638-1644, 1740.
- [11] 郑加梅, 尚明越, 王嘉乐, 等. 木香的化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 4198-4213.
Zheng J M, Shang M Y, Wang J L, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of *Aucklandiae Radix* and prediction analysis on Q-Marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022,

- 53(13): 4198-4213.
- [12] 魏广义, 刘楠楠, 王淑美, 等. 抗胃溃疡中药实验研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(5): 228-232.
Wei G Y, Liu N N, Wang S M, et al. Experimental progress on traditional Chinese medicines against gastric ulcer [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(5): 228-232.
- [13] 尤思路, 李娟, 晏陶, 等. 黄连-白术复方对小鼠胃溃疡模型的预防作用 [J]. 中南大学学报(医学版), 2020, 45(1): 8-16.
You S L, Li J, Yan T, et al. Preventive effects of *rhizoma coptidis* and *Atractylodes* on mice with gastric-ulcer [J]. J Cent South Univ Med Sci, 2020, 45(1): 8-16.
- [14] Jin Y, Zhang M, Wang Y, et al. Protective effect and potential mechanism of the traditional chinese medicine Shaoyao-Gancao Decoction on ethanol-induced gastric ulcers in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 3069089.
- [15] Zhang W, Liang X, Chen X Y, et al. Time trends in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with peptic ulcer disease: A single-center retrospective study in Shanghai [J]. J Int Med Res, 2021, 49(10): 3000605211051167.
- [16] 姚晓艳, 刘文, 宋信莉, 等. 左金对乙醇诱导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.
Yao X Y, Liu W, Song X L, et al. Effect and mechanism of Zuojin pills on gastric ulcer induced by ethanol in rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(10): 2404-2407, 2565.
- [17] Haber P S, Kortt N C. Alcohol use disorder and the gut [J]. Addiction, 2021, 116(3): 658-667.
- [18] Manu P, Rogozia L M, Dumitraşcu D L. Pharmacological management of inflammatory bowel disease: A century of expert opinions in Cecil textbook of medicine [J]. Am J Ther, 2022, 29(5): e500-e506.
- [19] Yuksel M B, Kavak S, Gecit I, et al. Short-term levosimendan treatment protects rat testes against oxidative stress [J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(8): 716-720.
- [20] Ito M, Suzuki Y, Ishihara M, et al. Anti-ulcer effects of antioxidants: Effect of probucol [J]. Eur J Pharmacol, 1998, 354(2/3): 189-196.
- [21] Yoo J H, Lee J S, Lee Y S, et al. Protective effect of bovine milk against HCl and ethanol-induced gastric ulcer in mice [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(5): 3758-3770.
- [22] Peng Y C, Huang L R, Shyu C L, et al. Interaction of omeprazole and *Helicobacter pylori*-induced nuclear factor- κ B activation and mediators in gastric epithelial cells [J]. J Chin Med Assoc, 2014, 77(11): 567-572.
- [23] Takahashi S, Fujita T, Yamamoto A. Role of nuclear factor- κ B in gastric ulcer healing in rats [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(6): G1296-G1304.
- [24] Subhash V V, Ho B. Inflammation and proliferation - a causal event of host response to *Helicobacter pylori* infection [J]. Microbiology, 2015, 161(6): 1150-1160.
- [25] Jin B R, Chung K S, Cheon S Y, et al. Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation [J]. Sci Rep, 2017, 7: 46252.
- [26] Ahmed S M U, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(2): 585-597.
- [27] Ilchovska D, Barrow D M. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions [J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(2): 102741.
- [28] 桂文琪, 方媛, 聊晓玉, 等. 基于网络药理学和体内实验验证霍山石斛治疗胃溃疡的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 151-161.
Gui W Q, Fang Y, Liao X Y, et al. Mechanism of *Dendrobium huoshanense* in treatment of gastric ulcer: Based on network pharmacology and in vivo experiment [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(7): 151-161.
- [29] Van den Berg R, Haenen G R M M, van den Berg H, et al. Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress [J]. Br J Nutr, 2001, 86(S1): S121-S127.
- [30] 崔兵迪, 郭辉, 龚曼, 等. 基于 Akt/NF- κ B 信号通路探讨牛蒡根水提物对盐酸/乙醇诱导的急性胃溃疡大鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(2): 1-9.
Cui B D, Guo H, Gong M, et al. Protective effect of aqueous extract of *Arctium lappa* roots on HCl/EtOH-induced acute gastric ulcer in rats based on Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(2): 1-9.

[责任编辑 兰新新]