

• 药理与临床 •

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

周红祖¹, 黎莹斯², 陈永恒², 侯梅轩², 余惠旻^{2*}

1. 深圳市中医院, 广东 深圳 518020

2. 深圳大学医学院, 广东 深圳 518060

摘要: **目的** 研究左金方对幽门螺旋杆菌引起人正常胃黏膜上皮(GES-1)细胞增殖与凋亡的影响。**方法** 幽门螺旋杆菌以不同的感染复数(1:1、50:1、100:1、200:1、300:1)感染 GES-1 细胞, 于 12、24、48 h 后, CCK-8 检测细胞的增殖活性; 以不同质量浓度(0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g/mL}$)左金方作用幽门螺旋杆菌感染的 GES-1 细胞 12、24、48 h 后, 收集细胞, CCK-8 检测细胞的增殖活性, 流式细胞仪和 Western blotting 检测细胞的凋亡率; Hoechst 染色检测凋亡细胞的形态学改变。**结果** 幽门螺旋杆菌感染 GES-1 细胞后, 感染复数越大, 感染时间越长, 抑制细胞生长和促进细胞凋亡的作用越强, 幽门螺旋杆菌以 100:1 的感染复数作用人 GES-1 细胞 12、24、48 h 后, 细胞存活率分别降低到(80.57 \pm 1.21)%、(70.04 \pm 3.21)%、(67.74 \pm 2.91)%, 细胞的凋亡率分别增加到(23.74 \pm 1.71)%、(53.60 \pm 1.87)%、(70.67 \pm 2.87)%; 与 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 左金方共培养 24 h 后, 细胞存活率上升到(97.67 \pm 1.04)%, 细胞凋亡率降低到(31.04 \pm 1.02)%, 与相应模型组对比, 差异显著($P < 0.01$); Western blotting 结果表明, 左金方各处理组细胞 Caspase-3 蛋白水平表达均明显降低; Hoechst 荧光染色, 从形态学的角度进一步验证了这一结果。**结论** 幽门螺旋杆菌感染人 GES-1 细胞后, 可以抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 左金方可以降低幽门螺旋杆菌引起的细胞损伤, 保护 GES-1 细胞。

关键词: 左金方; 幽门螺旋杆菌; 人正常胃黏膜上皮细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)04-0880-08**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.014**Effect of Zuojin Formula on proliferation and apoptosis of human GES-1 cells infected by *Helicobacter pylori***ZHOU Hong-zu¹, LI Ying-si², CHEN Yong-heng², HOU Mei-xuan², YU Hui-min²

1. Shenzhen Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518020, China

2. School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

Abstract: Objective To study the effect of Zuojin Formula on proliferation and apoptosis of human normal gastric epithelial cells (GES-1) cells infected by *Helicobacter pylori*. **Methods** GES-1 cells were infected by *H. pylori* at different multiplicity of infection (1:1, 50:1, 100:1, 200:1, 300:1) for 12, 24, 48 h; GES-1 cells infected by *H. pylori* were treated with different concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{g/mL}$) of Zuojin Formula, and the cells were harvested after 12, 24, and 48 h. The proliferation activity of cells was detected by CCK-8, and the apoptosis rate of GES-1 cells was measured by Annexin V-FITC apoptosis detecting kit and flow cytometry. Moreover, the expression of Caspase-3 was detected by Western blot and the morphological changes of apoptotic cells were detected by Hoechst staining. **Results** After infected by *H. pylori*, the cell viability showed a descending trend while the apoptotic rate showed tendency to ascend, with the increasing of multiplicity of infection and infection time. GES-1 cells were treated with multiplicity of infection of *H. pylori* at 100:1 for 12, 24, 48 h, and the cell viability decreased to (80.57 \pm 1.21)%, (70.04 \pm 3.21)%, and (67.74 \pm 2.91)%, while the apoptotic rate increased to (23.74 \pm 1.71)%, (53.60 \pm 1.87)%, and (70.67 \pm 2.87)%. After co-cultured with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Zuojin Formula for 24 h, the cell viability increased to (97.67 \pm 1.04)%, and the apoptotic rate

收稿日期: 2018-10-28**基金项目:** 深圳市知识创新基础研究(自由探索)(JCYJ20170818094033689); 深圳大学教学改革项目(JG2017035); 深圳大学聚徒+创研项目(2018 延续); 中药特色技术传承人才培养项目(粤中医办函[2016]54号)**作者简介:** 周红祖, 女, 副主任药师, 主要从事中药学基础及中药药理、鉴定研究。E-mail: zhouhzu@163.com***通信作者** 余惠旻, 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药及其复方与幽门螺杆菌的研究。E-mail: yuhuimin@szu.edu.cn

decreased to $(31.04 \pm 1.02)\%$, and the difference was statistically significant compared with the corresponding model group ($P < 0.01$). The results of Western blotting showed that the protein expression of Caspase-3 of all treatment groups was obviously decreased. Based on the morphological point of view, this result was further verified. **Conclusion** GES-1 infected by *H. pylori* NCTC11637 can inhibit cell proliferation and induce apoptosis, while ZuoJinFang could protect GES-1 cells from cell damage.

Key words: Zuojin Formula; *Helicobacter pylori*; human normal gastric epithelial cells; proliferation; apoptosis

幽门螺旋杆菌 *Helicobacter pylori* 是高感染率的慢性感染性致病菌, 在全球范围内感染率高达50%以上, 我国的平均感染率约为59%, 被广泛认为是导致人类慢性胃肠道炎症、溃疡、胃腺癌以及黏膜淋巴瘤的重要致病因子^[1]。国内外采用抗生素三联、四联常规治疗幽门螺旋杆菌感染, 在相关消化系统疾病中取得了较大的临床疗效, 但是临床上广谱抗生素的使用, 使幽门螺旋杆菌耐药现象不断涌现, 很多患者治愈后又反复发作, 并出现不良反应, 难以根除幽门螺旋杆菌^[2-3]。在幽门螺旋杆菌的抗感染治疗中, 中医药的应用越来越受到重视^[4]。左金方出自元代医家朱震亨的《丹溪心法》^[5], 由黄连、吴茱萸按6:1比例组成, 目前主要用于治疗消化系统内外的功能失调、炎性疾病或肿瘤。前期研究发现左金方能有效抑制幽门螺旋杆菌在体内外的生长^[6], 本实验在前期研究结果的基础上, 以不同感染复数的幽门螺旋杆菌感染人正常胃黏膜上皮细胞(GES-1), 观察左金方对幽门螺旋杆菌感染的GES-1细胞增殖和凋亡的影响, 以期为左金方作为单一或联合用药治疗幽门螺旋杆菌感染提供一定的参考。

1 材料

1.1 细胞与细菌

GES-1细胞(深圳大学医学部细胞中心提供); 幽门螺旋杆菌 *H. pylori* 国际标准株 NCTC11637(美国 National Collection of Type Culture)。

1.2 仪器

细菌三气培养箱(美国 THERMO 公司); 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); 细胞培养箱(美国 Shella 公司); DC300型荧光倒置相差显微镜(德国莱卡公司); Rotofix32型离心机(德国赫蒂奇公司); EpicsXL型流式细胞仪(美国贝克曼公司); Polarstar Galaxy型酶标仪(德国 BMG 公司)。

1.3 主要药物与试剂

黄连、吴茱萸药材均购自华辉药业有限公司, 由深圳市中医院中药科刘志承主任中药师鉴定, 黄连为毛茛科植物云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎, 吴茱萸为芸香科植物石虎 *Evodia rutaecarpa*

(Juss) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 干燥近成熟的果实^[7]; 三联药物组合(枸橼酸铋钾片、替硝唑片、克拉霉素片, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号170804); 克拉霉素缓释胶囊(广州柏赛罗药业有限公司, 批号1709026, 0.25 g/片); 甲硝唑(开封制药集团有限公司, 批号171104); Cell Counting Kit-8(CCK-8, 日本同仁化学研究所 Dojindo, 批号LA778); Alexa Fluor[®] 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit(美国 Life Technologies 公司, 批号1705909); 高糖 DMEM 培养基(美国 HyClone, 批号8117070); 胰酶(美国 HyClone 公司, 批号030718); 胎牛血清(四季青生物工程材料有限公司, 批号20171113); CAMPYLOBACTER AGAR BASE(CM0935, 美国 OXOID 公司, 批号1872340); Caspase-3 抗体(美国 CST 公司); Hoechst 33258 荧光染料(瑞士 Fluka 公司)。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 左金方冻干粉的制备 由本实验室自制, 取黄连60 g、吴茱萸10 g, 按传统煎煮方法, 加10倍蒸馏水浸泡30 min, 加水煎煮3次(每次30 min), 滤过后合并3次滤液, 于冷冻干燥机中干燥, 每克干粉相当于生药3.98 g。经 HPLC 法分析测定, 冻干粉含小檗碱39.90%、巴马汀10.01%、药根碱5.36%、吴茱萸碱0.28%、吴茱萸次碱0.35%。将左金方冻干粉溶于去离子水中制备成1.0 mg/mL的母液储藏备用^[8-9]。

2.1.2 阳性药物制备 ①克拉霉素: 取克拉霉素缓释胶囊按实验设计加超纯水制备成3.0 μg/mL的母液; ②甲硝唑: 取甲硝唑片按实验要求加超纯水制备成9.0 μg/mL的母液; ③三联药物溶液: 按实验设计分别取枸橼酸铋钾片、替硝唑片、克拉霉素片加超纯水制备40.0 mg/mL的母液。所有药液经0.22 μm 一次性针头滤器滤过除菌备用。

2.2 细胞培养

GES-1细胞常规培养, 接种在DMEM培养液(含9%胎牛血清), 于37℃、5% CO₂、100%湿度

的培养箱中培养。取指数生长期的 GES-1 细胞，用 DMEM 培养基制成细胞悬液，按每孔 5×10^3 个加入 96 孔板，或按每孔 2.5×10^5 个加入 6 孔板，细胞完全贴壁。

2.3 幽门螺旋杆菌的培养

取 100 μL 对数生长期幽门螺旋杆菌液约 2×10^7 CFU/mL，用一次性涂布器均匀涂于 CAMPYLOBACTER AGAR BASE 培养基上，置含 85% N_2 、10% CO_2 和 5% O_2 的三气培养箱中培养，于 48 h 收集细菌，然后重悬于磷酸缓冲液 (PBS) 中，在麦氏比浊仪中检测并制备适宜的实验菌液浓度。

2.4 观察指标和测定方法

2.4.1 药物血琼脂平板的制备 称取 8.6 g CAMPYLOBACTER AGAR BASE 粉末，加入 500 mL 锥形瓶内，按照实验设计，减去欲加入药物 (不同质量浓度左金方、克拉霉素、甲硝唑及三联药物) 的体积，加蒸馏水使终体积为 186 mL，高压消毒，于 60 $^\circ\text{C}$ 左右加入脱脂羊血，然后加入相应的药物，充分摇匀，制备含不同药物的血琼脂平皿，同时以不含任何药物的空白培养基作为对照。

2.4.2 幽门螺旋杆菌生长曲线的绘制 用 CAMPYLOBACTER AGAR BASE 培养基，取浓度约为 2×10^7 CFU/mL 的幽门螺旋杆菌对数期菌液 100 μL ，均匀涂布于制备好的基础培养基上，重复 3 块，分别于 0、12、18、24、36、42、48、60、72、84 h，刮取细菌用 PBS 缓冲液重悬，置麦氏比浊仪中，检测菌液浓度。

2.4.3 琼脂稀释法测定药物最小抑菌浓度 (MIC) 按照美国 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 制定的琼脂稀释法进行药物抗菌实验。取浓度约为 2×10^7 CFU/mL 的幽门螺旋杆菌对数期菌液 100 μL ，均匀涂布于制备好的含药血琼脂平皿上，每个样本重复 3 块培养皿，于 85% N_2 、10% CO_2 和 5% O_2 、相对湿度 95% 的三气培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 0~72 h，监测细菌生长情况，以平皿上检测不到菌落的药物浓度为 MIC。

2.4.4 GES-1 细胞存活率的检测 待 GES-1 细胞完全贴壁后，根据实验要求加入不同感染复数 (MOI, 1:1、50:1、100:1、200:1、300:1) 的幽门螺旋杆菌菌液，或加入幽门螺旋杆菌菌液的同时，分别加入相应的阳性药物及不同质量浓度 (0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的左金方药液，同时设对照组 (不加幽门螺旋杆菌菌液，不加药物，只加细胞) 共培

养 12、24、48 h，然后按 CCK-8 检测试剂盒操作，孵育 3 h 后，测定吸光度 (A) 值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4.5 GES-1 细胞凋亡的检测 在幽门螺旋杆菌菌液和左金方分别作用 12、24 h 后，弃培养液，用预冷的 PBS 10 mL 清洗，胰酶消化，收集细胞，1 200 r/min 离心 10 min 后，PBS 将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL。加入 500 μL 工作液和荧光染料 (10 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI 混合液，滤过)，避光染色，上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.4.6 Western blotting 检测 Caspase-3 的表达 在 1 mL 细胞裂解液 RIPA 中先加入 PMSF 10 μL ，取经药物处理后的细胞约 2.4×10^6 个加入 RIPA，冰浴裂解 30 min，10 000 r/min 离心 10 min，取上清。根据 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，酶标仪设定波长为 562 nm。灌制 12% 分离胶、4% 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶。蛋白上样量为 40 μg ，110 V 电泳，湿法转至 PVDF 膜。5% 的脱脂奶粉/PBS-T 封闭，按 1:1 000 稀释兔抗 Caspase-3，4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。1:2 000 稀释二抗羊抗兔 IgG，孵育 2 h，增强化学发光 (ECL) 显影，化学发光系统摄像。

2.4.7 Hoechst 染色观察细胞形态 新鲜配制的 4% 多聚甲醛 (pH 7.4)，按实验要求加入不同受试因素处理后的各组 (对照组、模型组、三联药物 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和左金方 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组，分别以培养基、幽门螺旋杆菌菌液、幽门螺旋杆菌菌液+三联药物、幽门螺旋杆菌菌液+左金方处理 24 h) 细胞中，37 $^\circ\text{C}$ 固定细胞 30 min，PBS 清洗 2 次，加入 5 mg/mL Hoechst 33258 染液，染色 30 min，PBS 清洗后，用 pH 5.5 的封片液 (20 mmol/L 柠檬酸、50 mmol/L 磷酸氢二钠、50% 甘油) 封片，在荧光显微镜下观察、拍摄。

2.5 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 22.0 进行统计分析，组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 幽门螺旋杆菌的生长曲线

结果显示，幽门螺旋杆菌在培养 24、36、72、84 h 的细菌数量分别为 $(1.950 \pm 0.480) \times 10^8$ 、 $(4.500 \pm 0.600) \times 10^8$ 、 $(2.330 \pm 0.101) \times 10^{10}$ 和 $(1.959 \pm 0.084) \times 10^{10}$ CFU/mL，细菌生长曲线如图 1 所示，细菌在 36~72 h 进入对数生长期。选取 48 h 对数生长期的幽门螺旋杆菌开展后续研究。

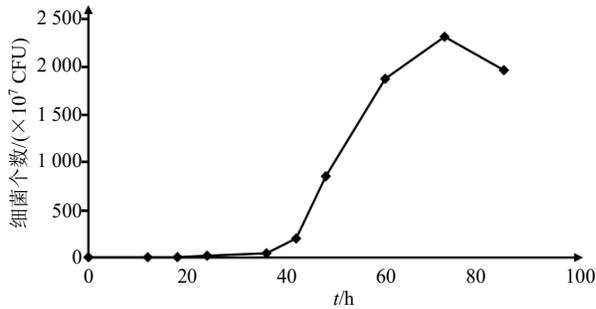


图 1 幽门螺旋杆菌生长曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Growth curve of *H. pylori* NCTC 11637 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 幽门螺旋杆菌对 GES-1 细胞存活率的影响

幽门螺旋杆菌以不同感染复数 (1 : 1、50 : 1、100 : 1、200 : 1、300 : 1) 作用于 GES-1 细胞 12、24、48 h 后的结果显示, 同一感染复数下, 随着时间的延长, 细胞存活率呈现下降的趋势; 同一时间下, 随着感染复数的递增, 细胞的存活率同样呈现下降的趋势。以感染复数 100 : 1 为例, 幽门螺旋杆菌与 GES-1 细胞共培养 12、24、48 h 后, 细胞存活率分别为 (80.57 ± 1.21) %、(70.04 ± 3.21) % 和 (67.74 ± 2.91) %, 与对照组相比, 显著降低 ($P < 0.01$), 结

果见表 1。

3.3 不同感染复数幽门螺旋杆菌对 GES-1 细胞凋亡的影响

幽门螺旋杆菌以不同感染复数 (1 : 1、50 : 1、100 : 1、200 : 1、300 : 1) 作用于 GES-1 细胞 12、24、48 h 后, 细胞凋亡率随着感染复数的递增, 作用时间的延长, 呈现上升的趋势。以感染复数 100 : 1 为例, 幽门螺旋杆菌与 GES-1 细胞共培养 12、24、48 h 后, 细胞凋亡率分别为 (23.74 ± 1.71) %、(53.60 ± 1.87) %、(70.67 ± 2.87) %, 与对照组相比, 显著增加 ($P < 0.01$); 作用 24 h, 100 : 1、200 : 1、300 : 1 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 2 和图 2。结合幽门螺旋杆菌不同感染复数作用于 GES-1 细胞 12、24、48 h 后对细胞存活率的影响, 选择感染复数 100 : 1, 作用时间 24 h 开展后续实验。

3.4 左金方对幽门螺旋杆菌的生长抑制情况

实验结果显示, 幽门螺旋杆菌对阳性药物克拉霉素和三联药物的敏感性明显高于甲硝唑, 克拉霉素和三联药物的 MIC (48 h) 分别为 0.9、4.5 μg/mL, 甲硝唑的 MIC (48 h) 为 200.0 μg/mL, 左金方的 MIC (48 h) 为 119.4 μg/mL。

表 1 不同感染复数幽门螺旋杆菌对 GES-1 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 GES-1 cell viability induced by *H. pylori* with different multiplicity of infection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	感染复数	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	—	100.00 ± 0.49	100.00 ± 1.46	100.00 ± 1.55
幽门螺旋杆菌	1 : 1	98.43 ± 1.07**	97.24 ± 0.95**	90.10 ± 1.14**
	50 : 1	88.16 ± 1.52**	82.96 ± 1.65**	79.07 ± 2.15**
	100 : 1	80.57 ± 1.21**	70.04 ± 3.21**	67.74 ± 2.91**
	200 : 1	69.78 ± 1.81**	64.28 ± 2.74**	59.30 ± 3.43**
	300 : 1	65.95 ± 1.96**	59.44 ± 2.88**	61.64 ± 3.24**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 表 2 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as table 2

表 2 不同感染复数幽门螺旋杆菌诱导 GES-1 细胞凋亡的情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Apoptosis of GES-1 induced by *H. pylori* with different multiplicity of infection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	感染复数	细胞凋亡率/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	—	10.52 ± 1.64	12.37 ± 0.41	11.74 ± 1.65
幽门螺旋杆菌	1 : 1	12.34 ± 1.02*	21.70 ± 1.97*	47.17 ± 1.19**
	50 : 1	17.19 ± 1.26**	38.20 ± 2.03**	60.03 ± 2.09**
	100 : 1	23.74 ± 1.71**	53.60 ± 1.87**	70.67 ± 2.87**
	200 : 1	25.18 ± 1.91**	57.30 ± 2.07**	72.37 ± 3.14**
	300 : 1	27.85 ± 1.46**	58.93 ± 1.93**	74.41 ± 3.15**

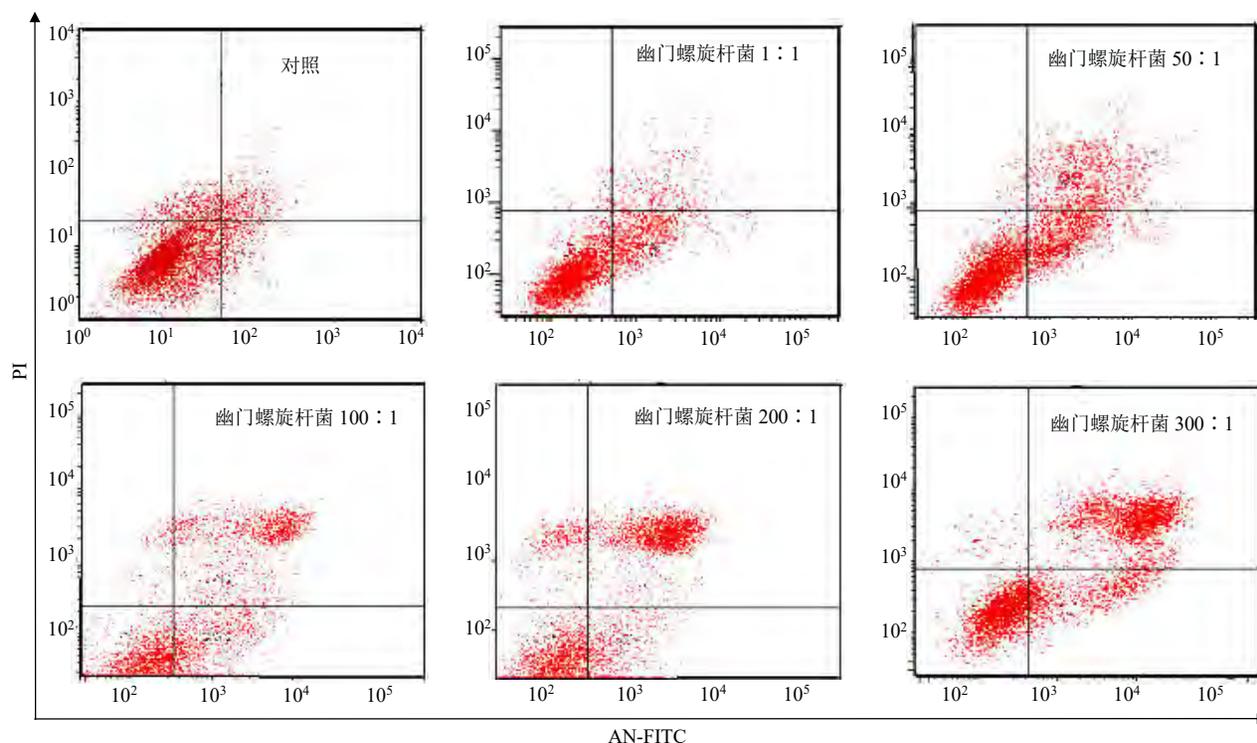


图 2 不同感染复数幽门螺旋杆菌作用 GES-1 细胞 24 h 诱导凋亡的情况

Fig. 2 Apoptosis of GES-1 induced by *H. pylori* with different multiplicity of infection at 24 h

为了进一步明确克拉霉素、甲硝唑、三联药物和左金方抑制幽门螺旋杆菌生长的具体情况,检测了 48 h 后细菌的抑制率在 0、30%、60%、90%、100%时对应的药物质量浓度,质量浓度小于 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的克拉霉素、30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甲硝唑、0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三联药物和 95.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左金方对细菌的生长没有影响,选取低于 95.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左金方开展后续研究,见表 3。

3.5 左金方对幽门螺旋杆菌诱导 GES-1 细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

选取 48 h 对数生长期的幽门螺旋杆菌,以 100 : 1 感染 GES-1 细胞,分别加入三联药物 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和左金方 0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共同孵育 GES-1 细胞 24 h 后,检测到凋亡率,与对照组比较,

模型组细胞凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.01$),与模型组比较,各给药组细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.01$),结果见图 3 和表 4。Western blotting 结果显示,与对照组比较,模型组细胞中 Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$),与模型组比较,左金方处理各组 Caspase-3 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01),结果见图 4,表明左金方可以对抗由幽门螺旋杆菌诱导的 GES-1 细胞凋亡,1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑制作用最好。

3.6 左金方对幽门螺旋杆菌感染的 GES-1 细胞形态的影响

经 Hoechst 33258 荧光染色后,荧光显微镜观察结果显示:对照组细胞膜结构均完整,外部轮廓

表 3 克拉霉素、甲硝唑、三联药物及左金方对幽门螺旋杆菌的抑制情况

Table 3 Inhibition of clarithromycin, metronidazole, triple therapy, and Zuojin Formula on *H. pylori* NCTC 11637

药物	不同抑制率对应的药物质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$				
	抑制率=0	抑制率 $\geq 30\%$	抑制率 $\geq 60\%$	抑制率 $\geq 90\%$	抑制率=100%
克拉霉素	$\rho < 0.55$	$0.55 \leq \rho < 0.65$	$0.65 \leq \rho < 0.80$	$0.80 \leq \rho < 0.90$	$\rho \geq 0.90$
甲硝唑	$\rho < 30.00$	$30.00 \leq \rho < 165.00$	$165.00 \leq \rho < 175.00$	$175.00 \leq \rho < 200.00$	$\rho \geq 200.00$
三联药物	$\rho < 0.75$	$0.75 \leq \rho < 1.55$	$1.55 \leq \rho < 3.00$	$3.00 \leq \rho < 4.50$	$\rho \geq 4.50$
左金方	$\rho < 95.00$	$95.00 \leq \rho < 108.00$	$108.00 \leq \rho < 115.00$	$115.00 \leq \rho < 119.40$	$\rho \geq 119.40$

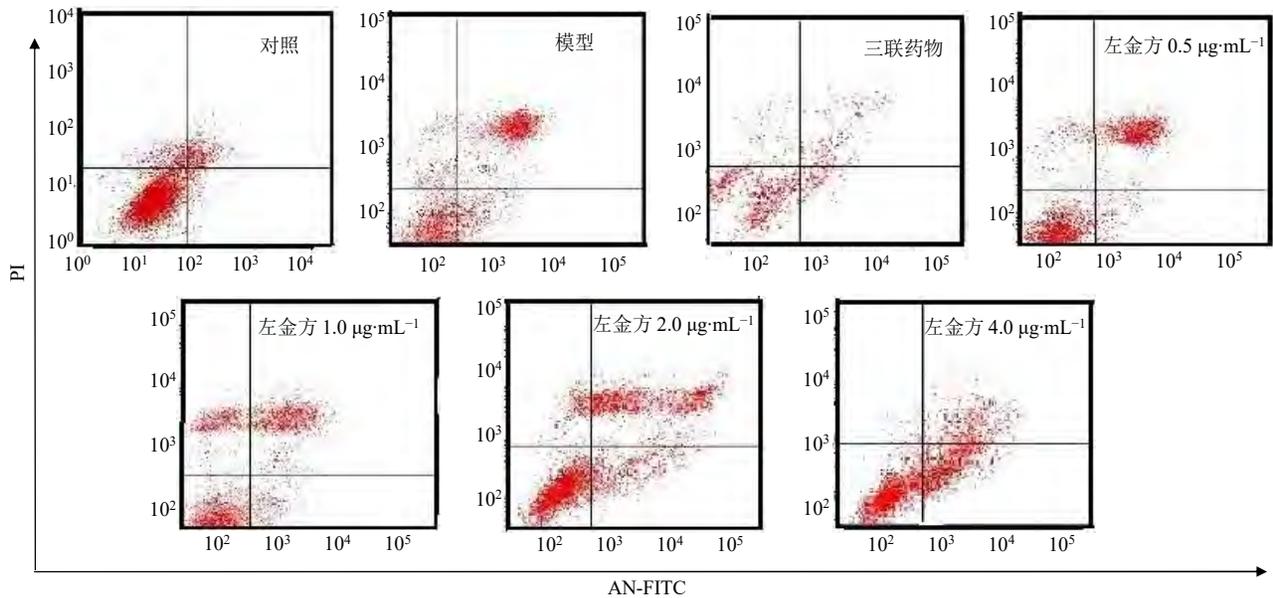


图 3 左金方对幽门螺旋杆菌感染 GES-1 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Apoptosis of GES-1 induced by *H. pylori* NCTC11637 after treated with Zuojin Formula

表 4 左金方对幽门螺旋杆菌感染的 GES-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Apoptosis of GES-1 induced by *H. pylori* NCTC11637 after treated with Zuojin Formula ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞凋亡率/%
对照	—	12.37±0.41
模型	—	51.74±1.54**
三联药物	1.0	28.74±1.37##
左金方	0.5	37.62±1.17##
	1.0	31.04±1.02##
	2.0	42.17±1.33##
	4.0	46.21±1.46##

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

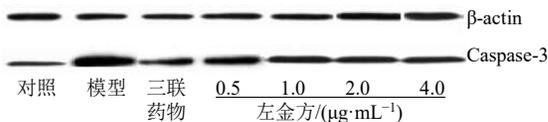


图 4 左金方对幽门螺旋杆菌感染 GES-1 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 4 Expression of Caspase-3 in GES-1 induced by *H. pylori* NCTC11637 after treated with Zuojin Formula

清晰, 细胞核形态饱满, 染色质着色浅且密度均匀一致, 呈现均匀弥漫的荧光; 幽门螺旋杆菌作用 GES-1 细胞 24 h 后, 细胞核或质内有浓缩或破碎的蓝色致密荧光, 呈现典型的细胞凋亡的形态特

征; 分别加入 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三联药物和左金方后, 细胞的凋亡特征得到明显改善, 见图 5。

3.7 左金方对幽门螺旋杆菌感染的 GES-1 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示, 不同质量浓度的左金方均能提高幽门螺旋杆菌感染的 GES-1 细胞的增殖活性。幽门螺旋杆菌作用 GES-1 细胞 12、24、48 h 后, 细胞存活率分别下降到了 (80.57±1.21) %、(70.04±3.21) %、(67.74±2.91) %, 与 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左金方共培养 12、24、48 h 后,

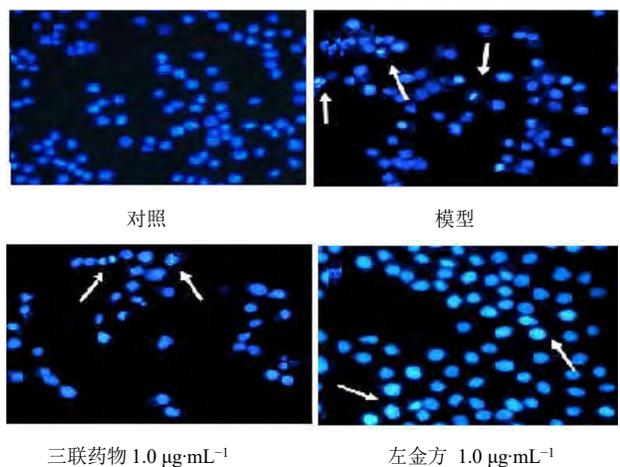


图 5 左金方对幽门螺旋杆菌感染 GES-1 细胞形态的影响 ($\times 100$)

Fig. 5 Morphological changes of GES-1 induced by *H. pylori* after treated with Zuojin Formula ($\times 100$)

细胞存活率分别上升到 (94.12±0.82)%、(97.67±1.04)%、(90.31±2.04)%，与相应模型组对比，

差异显著 ($P<0.01$)，说明左金方具有能够逆转幽门螺旋杆菌对细胞增殖的抑制作用，见表 5。

表 5 左金方对幽门螺旋杆菌感染的 GES-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 GES-1 cell viability induced by *H. pylori* NCTC11637 after treated with Zuojin Formula ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	—	100.00±0.39	100.00±0.46	100.00±0.55
模型	—	80.57±1.21**	70.04±3.21**	67.74±2.91**
三联药物	1.0	77.75±2.17#	65.27±2.03##	57.94±1.89##
左金方	0.5	83.16±0.91##	88.26±1.45##	95.23±1.91##
	1.0	94.12±0.82##	97.67±1.04##	90.31±2.04##
	2.0	84.08±0.96##	93.39±1.68##	96.34±2.24##
	4.0	81.01±0.79#	82.48±1.97##	88.55±3.02##

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

4 讨论

据流行病学资料显示，幽门螺旋杆菌是慢性消化系统感染性疾病的重要致病菌，在中国幽门螺旋杆菌的感染率高达 50%~80%。幽门螺旋杆菌通过趋化、黏附，定植于胃黏膜，引起慢性炎症，进而可发展为慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴瘤和胃癌等消化系统疾病^[10-11]。国际癌症研究组织将其正式列入 I 类致癌物。临床资料表明，根除幽门螺旋杆菌感染是降低消化系统炎性疾病及肿瘤的有效手段。临床上常用阿莫西林、甲硝唑、克拉霉素等抗菌药物组合奥美拉唑等质子泵抑制剂及铋剂等来对抗幽门螺旋杆菌感染，但广谱抗生素的广泛使用导致了幽门螺旋杆菌耐药菌株的不断出现和治愈后复发率的居高不下，并很快进入“感染-治愈-复发-再治疗-耐药”的恶性循环中，不能彻底解决问题^[12]。另外，由于幽门螺旋杆菌存在自发突变，在不合理使用或滥用抗生素的条件下，耐药菌株不断增加，导致临床疗效不稳定，药物副作用增大等后果，耐药率的升高是目前幽门螺旋杆菌临床治疗的首要难题，因此寻找新的对抗幽门螺旋杆菌感染的有效药物来克服以上的临床问题具有重要的意义。

祖国医学认为，幽门螺旋杆菌感染可以导致湿热、邪气^[13]。应用中医药治疗细菌感染具有效果稳定，不易产生耐药性，并在胃内易发挥作用等优势，在抗幽门螺旋杆菌感染中得以不断开发和应用^[14]。左金方中重用黄连为君药，清泻肝火，配辛热的吴茱萸，遏制黄连之寒，从而泻火且无凉遏之弊，两

味药相反相成，使肝火得泄，胃气得降，则诸症自愈^[15]。结合前期左金方体内外抑制幽门螺旋杆菌的实验研究^[6]，提示左金方很有可能成为一种抗幽门螺旋杆菌感染的潜在药物。

本实验结果表明，幽门螺旋杆菌感染 GES-1 细胞后，感染复数越大，侵染时间越长，抑制细胞生长和促进细胞凋亡的作用越强，如 100:1 的幽门螺旋杆菌感染人 GES-1 细胞 24 h 后，细胞的存活率为 (70.04±3.21)%，凋亡率为 (51.74±1.52)%；不同质量浓度的左金方 0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均可增加被感染的 GES-1 细胞的增殖活性，对抗由幽门螺旋杆菌诱导的 GES-1 细胞的凋亡，如 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左金方作用于被幽门螺旋杆菌感染的 GES-1 细胞 24 h 后，细胞的存活率增加到 (97.67±1.04)%，凋亡率上升到 (31.04±1.02)%，与模型组比较，差异显著 ($P<0.01$)；Caspase-3 蛋白在细胞凋亡的调控中发挥着关键作用，本实验 Western blotting 结果表明，左金方处理各组 Caspase-3 蛋白水平表达均明显降低，结合流式分析结果充分证实，左金方可以对抗由幽门螺旋杆菌诱导的 GES-1 细胞凋亡，1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑制作用最好；同时，Hochest 染色从细胞形态学的角度，进一步验证了上述结果。

从实验中可以看出，左金方抑制幽门螺旋杆菌的 MIC 是 119.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，小于 95.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量对幽门螺旋杆菌的生长没有影响，结果显示，1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物浓度对幽门螺旋杆菌的生长不会产生任何影响，但可以有效对抗幽门螺旋杆菌引起的细胞生长抑制，并能抑制幽门螺旋杆菌诱导的细胞凋

亡,从而发挥胃黏膜的保护作用。前期建立了幽门螺旋杆菌感染动物模型,通过胃黏膜病理组织学观察,左金方高、中、低剂量组对幽门螺旋杆菌感染均有不同程度的抑制作用,均可有效清除幽门螺旋杆菌,对胃黏膜起到保护作用^[6],与本实验结果是一致的。

本实验为左金方在临床上治疗幽门螺旋杆菌阳性的胃溃疡、胃炎甚至胃癌等疾病提供一定的实验依据,并为左金方作为单一或联合用药治疗幽门螺旋杆菌的感染提供一定的参考。

参考文献

- [1] Meine G C, Rota C, Dietz J, *et al.* Relationship between cagA-positive *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer: A case control study in Porto Alegre, RS, Brazil [J]. *Arq Gastroenterol*, 2011, 48(1): 41-45.
- [2] 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染治疗中的问题及其处理策略 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 3(30): 229-231.
- [3] 林凡松, 王 红, 陶可胜, 等. 难治性幽门螺杆菌感染的中医研究进展 [J]. 世界临床医学, 2016, 10(8): 167-168.
- [4] 王献献, 刘维明. 中医药治疗幽门螺杆菌感染相关胃病研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(9): 84-85.
- [5] 钱 平, 杨秀伟. 左金方的化学成分、抗肿瘤作用及体内过程研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 177-184.
- [6] 余惠旻, 候梅轩, 林敬斌, 等. 左金方体内外抑制幽门螺杆菌的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(3): 405-407.
- [7] 方玲子, 周红祖, 余惠旻. 左金方与反左金方抗 MPP+ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡作用的对比研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(7): 708-712.
- [8] 周红祖, 周禹练, 余惠旻. 左金方和 5-FU 对胃癌细胞生长及 BAX/Bcl-2 表达的调控研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(6): 777-791.
- [9] 邱 菡, 周红祖, 周禹练, 等. 左金方联合 5-FU 抑制人胃癌细胞 RF-48 的增殖作用研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(7): 929-932.
- [10] Yang J, Dai L X, Pan X, *et al.* Protection against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice by oral administration of multi-epitope vaccine of CTB-UreI-UreB [J]. *Pathog Dis*, 2015, 73(5): 1-9.
- [11] Agréus L, Hellström P M, Talley N J, *et al.* Andreasson, towards a healthy stomach? *Helicobacter pylori* prevalence has dramatically decreased over 23 years in adults in a Swedish community [J]. *Unit Eur Gastroenterol J*, 2016, 4(5): 686-696.
- [12] Vannarath S, Vilaichone R, Rasachak B, *et al.* Antibiotic resistant pattern of *Helicobacter pylori* infection based on molecular tests [J]. *Asian Pacific J Cancer Prevent*, 2016, 17(1): 285-287.
- [13] 徐方方, 周 洲. 中药抗幽门螺杆菌感染研究现状 [J]. 实用中医药杂志, 2016, 32(9): 945-947.
- [14] 李 江, 成 虹. 不同中药提取物对幽门螺杆菌耐药菌株体外抗菌活性研究 [J]. 现代中医临床, 2015, 22(2): 21-23.
- [15] 陈 奇. 中成药名方药理与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.